



BH

<p>(51) 国際特許分類6 A01K 67/027</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO96/28967</p> <p>(43) 国際公開日 1996年9月26日(26.09.96)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00703</p> <p>(22) 国際出願日 1996年3月18日(18.03.96)</p> <p>(30) 優先権データ PCT/JP95/00488 1995年3月17日(17.03.95) WO</p> <p>(34) 先の出願たる広域出願または国際出願がその国についてされた国の 国名 JP et al.</p> <p>(71) 出願人: および</p> <p>(72) 発明者 小池千裕(KOIKE, Chihiro)[JP/JP] 〒462 愛知県名古屋市中区八龍町1丁目30番地 カルチャー八竜701 Aichi, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>		<p>添付公開書類 国際調査報告書</p> <p>請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。</p>
<p>(54) Title : TRANSGENIC NON-PRIMATAL MAMMALS WHEREIN SEROTYPES OF HIGHER PRIMATES HAVE BEEN EXPRESSED BY FOREIGN GENE TRANSFER AND METHOD OF CREATING THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 外来遺伝子の導入により高等霊長類の抗原型を発現した非霊長哺乳類の形質転換動物及びその作出方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The hyperacute rejection occurring in the transplantation of tissues of a non-primatal mammal into a higher primate can be mitigated by transferring foreign genes of a higher primate, which express a sugar transferase, into a non-primatal mammal so as to express sugar-chain antigens of the higher primate.</p> <div data-bbox="836 1302 1356 1564"> <p>●: D-galactose ▲: N-acetylglucosamine □: L-fucose</p> <p>A B H抗原の生成 m</p> </div> <p>a ... Precursor b ... N-acetylglucosamine c ... in the absence of FT d ... in the absence of FT e ... Precursor intact f ... Bombay-type substance g ... in the presence of FT h ... in the presence of FT i ... B-type substance j ... G-type substance k ... A-type substance l ... B-type substance m ... Generation of ABH antigen</p>		

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

非霊長哺乳類の動物に、高等霊長類の糖転移酵素を発現させる外来遺伝子を導入し、高等霊長類の糖鎖抗原を発現するようする。これにより、非霊長類哺乳動物の組織を、高等霊長類へ移植する際の超急性拒絶反応を緩和することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	セイロン	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GB	ガブリウス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	IE	アイルランド		マウリタニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
						VN	ヴィエトナム

明細書

外来遺伝子の導入により高等霊長類の抗原型を発現した非霊長哺乳類の形質転換動物及びその作出方法

〔技術分野〕

この発明は、外来遺伝子導入により、高等霊長類への移植に適した細胞、組織あるいは臓器等を有する非霊長哺乳類の形質転換動物及びその動物の作出方法に関し、特に、非霊長哺乳類の糖鎖抗原を高等霊長類に特有な形に転換し、その状態を遺伝的に安定化させた形質転換動物及びその作出方法に関するものである。

〔背景技術〕

今日、ヒトの欠損あるいは不完全な組織を、代替物を移植することにより補充する治療法が一般的な治療法の一つとなりつつある。ここで、例えば組織とは、腎臓や肝臓等の臓器から、皮膚、血管、細胞までも含まれ、かかる組織の代替物としては、人工臓器や人工血管に代表される人工材料、自己の組織、さらには同種あるいは異種の動物の組織や細胞までが含まれるものである。

しかし、人工臓器の多くは、いまのところ人工弁の他は移植された動物体内で臓器として十分に機能できるまでには至っておらず、また、人工血管においては、その内部に血栓が生じやすいという欠点があり、とりわけ、人工血管の直径が小さいほど、その傾向が大きいという問題がある。

また、自己の組織を代替物として用いるにあたっては、補充用として利用可能な器官や量に極めて限りがあるし、かかる組織を摘出し、さらに補充するための身体への負担を考慮すれば、実際には不可能なことも多い。

さらに、ヒトに近い高等霊長類から摘出した組織により補充するには、その飼育上の問題から需要に応じ切れないとともに、倫理的観点等からの問題があるため、困難なことが多い。

一方、家畜は、非霊長哺乳類であって、その飼育方法が確立しており、容易に入手でき、倫理的問題も少ないため、代替物の提供体、いわゆるドナーとして有望である。

しかしながら、その反面、かかる哺乳動物から摘出した組織は、ヒトにおいては激しい拒絶反応を引き起こすことが知られ、特に24時間以内に発生する激しい拒絶反応（以下、超急性拒絶反応ともいう。）が問題となっている。

かかる超急性拒絶反応は、補充したドナー組織の血管をレシピエントの血管とを吻合して血液を灌流する際に、ドナーの組織内の血管内皮細胞で生じる。

この超急性拒絶反応は、ヒトが自然抗体を持つところの種との組み合わせにおいては、2種類あるヒトの補体系の活性化経路のうち、抗原抗体反応によって引き起こされる古典経路が主要な反応であると考えられている。この抗原抗体反応は、以下の原因によるものと考えられている。

まず、第1に、ブタなどの非霊長類哺乳動物の血管内皮細胞膜を含む脈管系細胞及び血球系細胞（以下、単に脈管・血球系細胞ともいう。）上の抗原性がヒト等の高等霊長類のそれと異なるからである。

すなわち、ブタなど非霊長哺乳類は、高等霊長類の持っていない彼ら特有の糖鎖抗原（以下、この抗原をG型抗原あるいはG型物質という。）をその脈管・血球系細胞膜表面に持っているからである。

第2に、ヒトはブタなどのG型抗原に対する自然抗体を生まれながらに持っているからである。

したがって、例えばブタをドナーとする場合に、ブタの血管の中にヒトの血液が流された際、ヒトの血液中の抗G自然抗体とブタの血管内皮細胞膜上のG型抗原との抗原抗体反応が引き起こされ、その結果形成された抗原抗体複合体が補体系を活性化し、ブタの血管内皮細胞が破壊され、補充したドナー組織の破壊につながり、超急性拒絶反応が生ずるのである。

かかる超急性拒絶反応を回避するために、非霊長哺乳類の組織を摘出してヒトに補充する際に、同時にヒト等のレシピエントにおける補体の活性を制限する物質を供給する技術も開示されているが（特発平5-503074号公報/WO91/05855）、そこに示されている補体制限因子を持ったブタの細胞とヒトの血流との関係は、基本的にはいわゆる異型輸血と同じ構造を持った関係となるため、超急性拒絶反応の発生を必ずしも防止できるものではなく、又、ヒトが動物の抗原に感作されるため、いわゆる血清病を誘発する可能性を併せもつと

いう不都合がある。

また、ドナーにおいてG型抗原の発現に係わる遺伝子に対するアンチセンスDNAを導入したり、この遺伝子の発現を完全に抑制したりしてドナー組織におけるG型抗原の発現を抑制しようとする考えもある(WO 94/21799)。しかし、この方法だけでは、ドナー組織に、G型抗原の前駆物質が蓄積されることになる。この前駆物質は、また、いわゆるボンベイ型抗原であるため、依然としてヒトに存する自然抗体による超急性拒絶反応を生じる場合がある。

さらに、同種移植の場合は免疫抑制剤の利用は有効な場合が多いが、異種移植の場合は多剤併用してもなお、今日、超急性拒絶反応を免れていない。

ここで、脈管・血球系細胞におけるABH型物質の異種間分布をみると、ABH型物質が発現されるのは、本発明にいう、高等霊長類、すなわち、真猿亜目のうち、ヒトやチンパンジー、オランウータン、ヒヒ、日本猿などが属する狭鼻猿類だけであって、他の霊長類や非霊長類哺乳動物では消化管粘膜や嗅覚受容体細胞などでは発現されていることがあるが、脈管・血球系細胞には発現されていない。

一方、非霊長哺乳類が脈管・血球系細胞に有するG型物質は、ABH型物質の前駆物質(N-アセチルラクトサミン)に対し、ガラクトースが $\alpha 1-3$ 構造で結合した物質である。

ABH型物質とG型物質の合成経路について図1に示す。

図1から明らかなように、本発明にいうH型物質(H型抗原ともいう。)は前駆物質(N-アセチルラクトサミン)に対して、GDP-L-フコース: β -D-ガラクトシド 2- α -L-フコシルトランスフェラーゼ(以下、単にFTあるいは $\alpha(1, 2)$ フコシルトランスフェラーゼという。)が作用して生成され、G型物質は、前述のH型物質と同じ前駆物質であるN-アセチルラクトサミンに対してUDPガラクトース: β -D-ガラクトシル-1,4-N-アセチル-D-グルコサミニド α -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ(以下、単にGTあるいは $\alpha(1, 3)$ ガラクトシルトランスフェラーゼという。)が作用して生成されるのである。このように、ヒト等とブタ等における脈管・血球系細胞における抗原型の差異は、前駆物質に作用する酵素の差異、換言すれば、ブタ等に酵素GTが存

在し、反対にヒト等に酵素G Tが存在せず酵素F Tが存在するという差異に基づくものである。このような各種組織におけるA B H型物質の存否、酵素の存否は、進化に基づくものであると考えられている。

しかしながら、かかる高等霊長類と非霊長類哺乳動物におけるそれぞれ特有の糖鎖抗原の分布と、超急性拒絶反応の主たる場である血管内皮細胞等におけるこれら糖鎖抗原の差異を積極的に利用して、超急性拒絶反応を緩和することについては、従来全く着目されていなかった。

〔発明の開示〕

そこで、本発明は、従来の異種間移植における問題を解決するべく、家畜として広く飼育され入手の容易なブタ等の非霊長類哺乳動物において、従来にない新しい手法により、移植時の超急性拒絶反応を緩和して、非霊長類哺乳動物の組織を高等霊長類への移植に適用することを目的とするものである。

上記目的を達成するため、本発明者は、ブタ等の非霊長類哺乳動物において、遺伝子工学的・発生工学的に、例えばF T等の高等霊長類の糖転移酵素を発現させて、高等霊長類の抗原物質を積極的に生成せしめ、あるいは同時に、例えばG T等の非霊長類哺乳動物の糖転移酵素の発現を抑制して、脈管・血球系細胞を抗原的に高等霊長類型に転換することにより、高等霊長類に非霊長類哺乳動物の組織を移植した際の超急性拒絶反応を緩和できることを見出し、以下の発明を完成したのである。

なお、異種間移植の超急性拒絶反応を緩和させるために、ドナーにおいてヒト等の高等霊長類とおなじH型物質を発現させることは従来考えられていない。すなわち、従来は、自然抗体と抗原との結合後における補体活性化経路の抑制等に着目されていた。また、本発明は、ヒト等の高等霊長類における抗G自然抗体とG型抗原との結合自体を抑制する点で、従来の手法に対し、より本質的な解決手段といえる。

第1の発明は、高等霊長類のF TをコードするDNA配列を含むDNA構築物が導入され、H型抗原を発現するように形質転換されていることを特徴とする非霊長哺乳類の形質転換動物である。このDNA構築物が導入された動物では、F Tが発現され、このF TがN-アセチルラクトサミンに作用して、H型抗原を

発現する。このため、非霊長哺乳類にGT遺伝子があっても、FTがGTの基質であるN-アセチラクトサミンを消費すると、内在される非霊長哺乳類のGTとN-アセチラクトサミンとの結合が抑制され、G型抗原の発現が抑制される。

これらの外来DNAは、ヘテロの状態で保持されていても、ホモの状態で保持されていてもかまわないが、ホモの状態で保持されることが好ましい態様である。

なお、本発明において、高等霊長類とは、霊長類の真猿亜目のうち、ヒトやチンパンジー、オランウータン、ヒヒ、日本猿などが属する狭鼻猿類をいう。また、非高等霊長類とは、霊長類の真猿亜目のうちの広鼻猿類及び原猿亜目をいう。また、非霊長哺乳類あるいは非霊長類哺乳動物とは、霊長類でない哺乳類をいう。

また、第2の発明は、高等霊長類のFTをコードするDNA配列を含む第1のDNA構築物と、非霊長哺乳類のGT遺伝子に対してアンチセンスであるDNA配列を含む第2のDNA構築物が導入され、高等霊長類のH型抗原を発現する一方、非霊長哺乳類のG型抗原の発現を低減するように形質転換されていることを特徴とする非霊長哺乳類の形質転換動物である。

第1のDNA構築物が導入されて形質転換されると、FTが発現され、H型抗原が発現される。同時にG型抗原が低減される。また、第2のDNA構築物が導入されると、GTの発現が抑制されて、G型抗原が低減される。

これらの外来DNAは、ヘテロの状態で保持されていても、ホモの状態で保持されていてもかまわないが、ホモの状態で保持されることが好ましい態様である。

また、第3の発明は、非霊長哺乳類のGT遺伝子の一部に、FTをコードするDNA配列を含むDNA構築物が相同組換えにより挿入され、非霊長哺乳類のG型抗原を発現することなく高等霊長類のH型抗原を発現するように形質転換されていることを特徴とする非霊長哺乳類の形質転換動物である。

この発明によると、このDNA構築物により非霊長哺乳類のGT遺伝子に変異が導入されることになるため、GTは発現されず、G型抗原は発現されない。一方、同時に、FTが発現され、このFTにより、H型抗原が発現される。また、この発明によれば、非相同組換えにより生ずるとされる形質転換動物への悪影響もない。なお、GT遺伝子の一部において相同組換えを起こすDNA構築物は、

G T 遺伝子をコードする DNA 配列と相同的な部分を有している。

これらの外来 DNA は、ヘテロの状態で保持されていても、ホモの状態で保持されていてもよいが、ホモの状態で保持されていることが好ましい態様である。

また、第 4 の発明は、非霊長哺乳類の G T 遺伝子の一部に、F T をコードする DNA 配列を含む DNA 構築物が相同組換えにより挿入され、非霊長哺乳類の G 型抗原を発現することなく高等霊長類の H 型抗原を発現するように形質転換された非霊長哺乳類の形質転換動物から得られた移植用材料である。この形質転換動物から得られた細胞自体、この細胞を構成要素とする組織、臓器、あるいはこれら以外のその他の材料は、幅広く高等霊長類への移植用材料に適用することができる。

なお、これらの発明における形質転換動物の好ましい態様は、前記非霊長哺乳動物が、ブタであることである。形質転換された動物がブタであると、このブタによって高等霊長哺乳類への移植に適した材料を提供することができる。

さらに、第 5 の発明は、非霊長哺乳類の G T 遺伝子の一部に、F T をコードする DNA 配列を含む DNA 構築物を相同組換えにより挿入し、非霊長哺乳類の G 型抗原を発現することなく高等霊長類の H 型抗原を発現するように形質転換した非霊長哺乳類の形質転換動物の作出方法である。

この方法によると、この DNA 構築物が導入されて形質転換されると、G T 遺伝子に変異が導入されて、G T は発現されず、代わりに F T が発現され、H 型抗原が発現される。

また、第 6 の発明は、非霊長哺乳類の組織を高等霊長類に移植する際の、高等霊長類の自然抗体と非霊長哺乳類の抗原とによる拒絶反応を回避する方法であって、

非霊長哺乳類の G T 遺伝子の一部に、F T をコードする DNA 配列を含む DNA 構築物を相同組換えにより挿入して、非霊長哺乳類の G 型抗原を発現することなく高等霊長類の H 型抗原を発現するように形質転換した非霊長哺乳類を作出する工程と、

この工程により得られた前記非霊長哺乳類の組織を高等霊長類に移植する工程を含んだ方法である。

この発明によると、非霊長哺乳類の組織においては、G型抗原でなくH型抗原が発現されている。このため、この組織を高等霊長類に移植した際に、高等霊長類の有する抗G自然抗体により拒絶されない。

(図面の簡単な説明)

図1は、前駆物質(N-アセチルラクトサミン)からのABH型物質とG型物質の合成経路を示す図である。

図2は、実施例1のFT遺伝子を有するプラスミドpMAM/FTを構築操作する過程図である。

図3は、実施例1のFT遺伝子導入用断片の模式図である。

図4は、実施例2のpREP8/AS/GTを構築操作する過程図である。

図5は、実施例2のAS/GT遺伝子導入用断片の模式図である。

図6は、実施例3のpREP9/GT3-4を構築操作する過程図である。

図7は、実施例3のpREP9/GT3-4/FT/ Δ SspI/ Δ DraIIIを構築操作する過程及び遺伝子断片GT3-4/FT/polyAの調製過程を図示したものである。

図8は、実施例3のpGT/FTを構築操作する過程図である。

図9は、 ^{51}Cr リリースアッセイの結果を示すグラフ図である。

図10は、GT遺伝子のエクソン2から3の部分からフラグメントAを得る方法を示した図である。

図11はGT遺伝子のエクソン4から6の部分からフラグメントBを得る方法を示した図である。

図12は、FT遺伝子のエクソン1から2から得られたcDNAを含んだプラスミドDを得る方法を示した図である。

図13は、フラグメントBとプラスミドDからプラスミドEを得る方法を示した図である。

図14は、フラグメントAとプラスミドEからコンストラクトを得る方法を示

した図である。

図 15 は、G T 遺伝子とコンストラクトが同所性組換えを起こした場合の変異遺伝子を示した図である。

図 16 において、16 A は F T をサザンブロッティング法により F T 内配列を検出した図であり、16 B は F T 遺伝子の上流側の相同部分を P C R により検出した図であり、16 C は、16 C はコンストラクトの F T の下流部分が相同組換えを起こしていること P C R で確認したことを示す図であり、16 D はノザンブロッティングにより F T 遺伝子の m R N A を検出したことを示す図であり、16 E は L 9 2 9 細胞が H 抗原を発現していないことをレクチン U E A 1 を用いたフローサイトメトリーを示した図であり、16 F は、F T 遺伝子が導入された L 9 2 9 細胞の H 抗原をレクチン U E A 1 で検出したことをフローサイトメトリーで検出した図である。

図 17 において、17 A は、F T 遺伝子を P C R で検出した図であり、17 B は、コンストラクトの F T の上流側の相同部分において相同的組換えが行われたことを示す P C R の図であり、17 C は、コンストラクトの F T の下流側の相同部分において相同的組換えが行われたことを示す P C R の図であり、17 D は F T 遺伝子の m R N A を検出した R T - P C R の図であり、17 E は L 9 2 9 細胞が H 抗原を発現していないことをレクチン U E A 1 を用いて示したフローサイトメトリーの図であり、17 F は、F T 遺伝子が導入された L 9 2 9 細胞の H 抗原をレクチン U E A 1 で検出したことをフローサイトメトリーで示した図である。

(発明を実施するための最良の形態)

F T を発現する形質転換動物

ブタ等の非霊長類哺乳動物の脈管・血球系細胞において、ヒトなど高等霊長類だけが持ち、ブタなどの非霊長類哺乳動物が持たない遺伝子あるいはその発現物質であるタンパク質を発現させるには、形質転換動物を作成することが必要になる。

ヒトとヒトとの移植における基本原則の一つとして血液型を合わせることが広く認められているが、いわゆる血液型すなわち A B O 式の分類の基本物質は H 型物質であって、それは脈管・血球系細胞においては、前述のように前駆物質 (N

ーアセチルラクトサミン)に糖転移酵素F Tが作用して形成される。しかし、ブタなど非霊長類哺乳動物は、F TでなくG Tを持ち、それによりヒトとは異なった物質(G型物質)を形成している。

したがって、例えば、H型物質をその前駆物質から生成する糖転移酵素F TをコードするF T遺伝子を含む外来遺伝子断片をブタ等の受精卵に導入し、この遺伝子断片が染色体上に組み込まれた場合、各細胞でこのF T遺伝子が転写翻訳され、酵素F Tが産生されてH型物質を発現させることが期待できる。

H型物質を発現した非霊長哺乳類動物は、組織・血液の抗原型が高等霊長類に近似され、これらの動物の組織等を高等霊長類に移植した際の超急性拒絶反応を緩和することができ、これらの動物の組織等は、高等霊長類への移植に適したものとなる。

さらに、H型物質の場合には、酵素F Tが前駆物質を消費すれば、それだけ、内在する酵素G Tと前駆物質との結合が阻害され、G型物質の生成が抑制されることも期待できる。なお、F T遺伝子はブタ染色体にくみこまれた後、安定して子孫に伝達されることが可能である。

さらに、本発明では、ブタ等の非霊長類哺乳動物に内在する糖転移酵素、例えば、G型物質をその前駆物質から生成する糖転移酵素G Tの遺伝子の発現を不活性化する目的で、G T遺伝子のアンチセンスDNAを含む外来遺伝子断片をブタ受精卵に導入する。この遺伝子断片が、個体の染色体上に組み込まれた場合、各細胞でこのアンチセンスDNAが転写されれば、その転写物は内在性のG T転写産物と対合して、G T遺伝子の翻訳が抑制されることが期待される。

この結果、個体レベルでは、酵素F Tが積極的に発現されるとともに、酵素G Tの発現が抑制されて、H型物質が生成される一方、一層G型物質の生成が低減されたブタ等を得ることができる。なお、アンチセンスDNA等の外来遺伝子断片は、染色体に組み込まれた後、安定して子孫に伝達されることが可能である。

なお、一旦、染色体に外来遺伝子が組み込まれた後、交配により外来遺伝子に関してホモの状態にすることが可能であり、高等霊長類の糖転移酵素を発現させる外来遺伝子に関してホモの状態の系と、非霊長哺乳類の糖転移酵素に関してホモの状態の系とを交配させることにより、非霊長哺乳類の酵素を発現するかわりに、高等霊長類の糖転移酵素を発現して、高等霊長類の抗原型を呈した非霊長類哺乳動物の系を得ることができる。

高等霊長類の糖転移酵素

本発明では、高等霊長類として、特にヒトを対象することができる。

高等霊長類の糖転移酵素とは、高等霊長類において見いだされ、非霊長哺乳類の脈管・血球系細胞において見いだされない抗原の生成に関与する糖転移酵素をいう。具体例としては、F Tを挙げることができる。特に、ヒトF Tは〔EC 2.

4. 1. 69] で特定される。

高等霊長類の糖転移酵素をコードするDNA配列を含むDNA構築物

高等霊長類の糖転移酵素をコードするDNA配列を含むDNA構築物は、該糖転移酵素の遺伝子のDNA配列の他、プロモータ、ターミネーター等を有することができる。SV40の初期遺伝子のポリA付加シグナルに続くターミネーターは付加に適した配列の一つである。一般的にどの遺伝子からとったポリAシグナルかによって遺伝子の発現のレベルはかなり左右されるが、SV40初期遺伝子から取ったポリA付加遺伝子が優れている。このシグナルはターミネーターの前に置かれる。FTを発現させることのできる外来遺伝子を形成するには、少なくともFTのDNA配列を知る必要がある。ヒトのFTについては、既に報告されている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(1990), pp6674-6678)。

非霊長哺乳類の糖転移酵素

非霊長哺乳類として、特に、前記高等霊長類に対して異種間移植の対象となる動物を対象とすることができる。さらに、家畜として飼育されるブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ等が好適である。これらの家畜は、飼育が容易で、安定した供給が可能のため、移植用組織の補充に適する。さらに、ブタが、臓器の大きさや、生理学的・生化学的な観点、発育が早く多産である点から好適である。

非霊長哺乳類の糖転移酵素とは、非霊長哺乳類の脈管・血球系細胞において見いだされ高等霊長類において見いだされない抗原の生成に関与する糖転移酵素をいう。具体例としては、ブタやマウスのGTを挙げることができる。特に、マウスGTは、[EC 2. 4. 1. 151]で特定される。

非霊長哺乳類の糖転移酵素を発現を抑制するDNA構築物

非霊長哺乳類の糖転移酵素の発現を抑制するDNA構築物には、該糖転移酵素をコードするDNA配列に対してアンチセンスであるDNA配列を含むDNA構築物、あるいは、該糖転移酵素の遺伝子において相同組換えされて、該遺伝子を他の遺伝子で置換したり、該遺伝子に他の遺伝子を挿入したり、変異を導入することにより、該遺伝子を破壊するDNA配列を含むDNA構築物を用いることができる。

このDNA構築物を形成するには、少なくとも非霊長哺乳類の糖転移酵素の遺伝子配列を知る必要がある。マウスGT遺伝子は、既に報告されている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(1989), pp. 8227-8231)。また、ブタGT遺伝子も既に報告されている(Xenotransplantation 1994; 1: pp. 81-88)。

例えば、GTのアンチセンスDNAを外来遺伝子とする場合には、GT遺伝子のcDNAの一部又は全部をアンチセンス方向に組み込んだDNA断片をDNA構築物として形成する。

また、相同組み換えによる場合には、例えばGT遺伝子との相同領域を可及的多く有するように形成するのが好ましい。

なお、非霊長哺乳類の糖転移酵素の発現を抑制するには、外来遺伝子の導入以外に従来公知の方法によることもできる。

相同組換え用DNA構築物

また、DNA構築物は、染色体における非相同組換えのみならず、相同組換えを目的として構築することもできる。この場合、例えば、ブタのGT遺伝子をターゲットに、ヒトのFT遺伝子を組み換えるようにすれば、GTの発現の抑制と、FTの発現が同時に可能である。

なお、以上説明したようなDNA構築物については、遺伝子断片が染色体に組み換えられた際に、高率に前記糖転移酵素が発現される手段を用いることができる。例えばpMAMをベクタープラスミドとして外来遺伝子断片を調製した場合には、ステロイドの投与により高発現が誘導されうる。

DNA構築物の導入

非霊長類哺乳動物への外来遺伝子の導入は、レトロウイルスを用いる方法やマイクロインジェクションによる方法等多数あるが、どの方法も採用することができる。子孫を得るという点からは、生殖細胞を形質転換することが望ましい。この場合の形質転換は、非霊長類哺乳動物の胚細胞やES細胞あるいは、受精卵に対して行うのが望ましい。

形質転換動物

このように、外来遺伝子が導入された非霊長類哺乳動物は、種々の細胞に

おける高等霊長類の糖転移酵素の発現により、あるいは同時に非霊長哺乳類の糖転移酵素の発現の抑制により、組織・血液の抗原型が高等霊長類に近似された動物となる。したがって、これらの動物の組織等を高等霊長類へ移植した際の超急性拒絶反応を緩和することができるようになり、これらの動物の組織等は、高等霊長類への移植に適したものとなる。また、特に、血管内皮細胞で発現された場合には、超急性拒絶反応が大きく緩和される。さらに、赤血球細胞における高等霊長類の糖転移酵素の発現により、血液の抗原型が高等霊長類に近似された動物となり、これらの動物の血液は高等霊長類の代替血液に適したものとなる。

また、高等霊長類の糖転移酵素F Tが導入された場合には、非霊長哺乳類の脈管・血球系細胞では、H型物質が発現されると同時にG型物質が低減されることになり、組織・血液の抗原型が高等霊長類に近似された動物となる。加えて、同時にG Tの発現を抑制する外来遺伝子も導入された場合には、より一層G型物質が低減され、組織・血液の抗原型が極めて高等霊長類に近似された動物となり、これらの組織・血液は、高等霊長類への移植・代替物により適したものとなる。特に、F Tが血管内皮細胞表面に発現されれば、異種間臓器あるいは組織移植における超急性拒絶反応が大きく緩和される。また、赤血球において発現されれば、代替血液により適したものとなる。

また、相同組換えにより、G TのかわりにF Tが発現するように形質転換された形質転換動物においては、染色体上の1本以上のG T遺伝子座のうち、一本が存在せず、同時にF Tが少なくとも1本存在するようになるため、交配により染色体上にG Tが1本も存在せず、その代わりにF Tが2本存在する個体を得ることができる。こうした個体はドナーとして、レシビエントのA B O式の血液型のいかなをとわずに、ヒト等の移植に適した移植材料を提供する。

産業上の利用可能性

このように、かかる形質転換された非霊長類哺乳動物は、ヒト等の高等霊長類に移植の可能な組織・血液を有するため、ヒト等の組織等の代替物の提供源となる。また、これらの動物が安定して飼育されることにより、必要時に、必要な組織等を提供可能となり、移植組織等の貯蔵体となる。

また、非霊長類哺乳動物における高等霊長類特有のF T遺伝子の発現により、異種間移植の場合に超急性拒絶反応を緩和できる動物や材料を提供する方法は、従来にない新規なものであるとともに、異種間移植における超急性拒絶反応の緩和のために、より本質的な解決をもたらすものである。

本発明の非霊長類哺乳動物の形質転換動物によれば、その組織・血液において、高等霊長類の糖鎖抗原が生成されるため、あるいは同時に非霊長類哺乳動物の糖鎖抗原の生成が抑制されるため、非霊長類哺乳動物の組織を異種間移植となる高等霊長類に移植した場合に超急性拒絶反応を緩和することができ、従来の人工血管や人工臓器、あるいは同種間で補充される臓器、組織等に代わり得る材料を提供することができる。

なお、本発明により非霊長類哺乳動物を形質転換することは、これらの動物にいかなる被害あるいは虐待を与えることがなく、また、本発明は、形質転換された非霊長類哺乳動物の生存、生殖等に悪影響を及ぼすものではない。さらに、本発明は、ヒトをはじめ他のいかなる動物に対しても悪影響を及ぼすものではない。

以下に本発明の実施例を示す。本発明に於ける外来遺伝子に関して、既に述べた2種類の糖転移酵素、即ちG T遺伝子とF T遺伝子のc DNAを例示できる。ただし、以下の実施例は、請求の範囲を制限するものではない。

(実施例1)

導入用遺伝子を含むプラスミド(pMAM/FT)の構築及びその遺伝子導入用断片の調製

(1) PCR法によるF T遺伝子断片の調製

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(1990), pp6674-6678に報告されたヒトのF T [EC2. 4. 1. 96] のDNA配列に基づいて、そのスタートコドンとストップコドンを含むような形でPCR用の2種類のプライマーを合成した。なお、その5'側のプライマーには、制限酵素NheIのサイトを付けた、また3'側のプライマーには、制限酵素XhoIのサイトを付けた。

一方、健康な成人の血液より白血球を採取し全RNAを抽出し、逆転写酵素を用いて、全RNAに対応するcDNAを合成した。このcDNAを鋳型にして、前記のプライマーを用いてPCRを施行した。

本PCR施行により得られたcDNA断片を1%アガロースゲル電気泳動にかけたところ、約1100bpの長さのバンドを得た。このPCR産物をpGEM-T (Promega 社製) に挿入した上で自動塩基配列読み取り機で塩基配列を読み取ったところ、前記既報の通りのFT遺伝子の塩基配列を有していた。そこでこのcDNAを0.8% Low Melting Point (以下、LMPという。) ゲルで電気泳動して精製した後、制限酵素NheIとXhoIで処理し、レジンを用いたPromega 社のWizard DNA精製システム (以下、Wizardシステムという。) により精製・分離した。なお、以下各種DNA断片の精製分離は、LMPゲル電気泳動とWizardシステムとを用いることにより行った。

(2) pMAM/FTの構築

哺乳類発現ベクターの一種であるpMAM (CLONETECH 社製、Lee, F. (1981) Nature 294:228) のマルチクローニング部位 (MCS) を制限酵素NheIとXhoIで処理し、この断片をLMPゲル電気泳動及びWizardシステムで精製・分離した。このベクターに精製・分離したFT遺伝子のcDNAを、T4 DNAリガーゼにより挿入させた。このプラスミドDNAによって、コンピテント状態のJM109細菌細胞を形質転換させて、得られた形質転換体をアンピシリンプレートで選択した。個々のコロニー毎にLB培地 (組成; Bacto-tryprone 10g (DIFCO社製)、Bacto-yeast extract 5g (DIFCO社製)、NaCl 10gを水にて1Lとする、以下同じ。) で増殖させ、ミニプラスミド調製を行った。抽出したプラスミドDNAを種々の制限酵素を使って消化した後に電気泳動して、挿入断片のサイズ及び位置方向を調べた。その結果、正しい方向に組み込まれているプラスミドを、pMAM/FTと称した (図2参照)。

(3) 遺伝子導入用断片の調製

さらに、遺伝子導入のための直鎖状断片とするために、大腸菌JM109/p

MAM/FT株をLB培地で大量培養した後に、プラスミド調製を行った。さらに、得られたプラスミドをCsCl密度勾配遠心法により精製した。精製したプラスミド10 μ gを、制限酵素PvuIとBamHIで消化後、この断片を精製・分離し、FT遺伝子導入用断片とした。この断片の構築模式図を図3に示す。

(実施例2)

導入用遺伝子を含むプラスミド(pREP8/AS/GT)の構築及びその導入用遺伝子断片の調製

(1) アンチセンスGTの調製

既報(Xenotransplantation 1994;1:pp81-88)に報告されたブタGT遺伝子のDNA配列に基づいて、そのスタートコドンとストップコドンを含むような形で2種類のPCR用のプライマーを合成した。なお、その5'側のプライマーには、制限酵素XhoIのサイトを付けた、また3'側のプライマーには制限酵素NheIのサイトを付けた。

一方、健康なブタの血液より白血球を採取し、その全RNAを抽出し、逆転写酵素を用いて全RNAに対応するcDNAを合成した。このcDNAを鋳型にして、前記のプライマーを用いてPCRを施行した。

本PCR施行により得られたcDNA断片を1%アガロースゲル電気泳動にかけたところ、約1100bpの長さのバンドを得た。このPCR産物をpGEM-T (Promega社製)に挿入した上で、自動塩基配列読み取り機で塩基配列を読み取ったところ、前記既報の通りのGT遺伝子の塩基配列を有していた。そこでこのcDNAをLMPゲルで電気泳動して精製した後、制限酵素NheIとXhoIで処理し、Wizardシステムを用いて精製・分離した。

(2) pREP8/AS/GTの構築

哺乳類発現ベクターの一種であるpREP8 (Invitrogen社製、George.R., et al. Gene. 81, 285(1989))のMCSを制限酵素XhoIとNheIで処理し、精製・分離した。このベクターに、T4 DNAリガーゼにより、精製・分離したGT遺伝

子のcDNAを、挿入した。このプラスミドDNAによって、コンピテント状態のJM109細菌細胞を形質転換させて、得られた形質転換体をアンピシリンプレートで選択した。個々のコロニー毎にLB培地で増殖させ、ミニプラスミド調製を行った。抽出したプラスミドDNAを種々の制限酵素を使って消化した後に電気泳動して、挿入断片のサイズ及び位置方向を調べた。その結果、正しくアンチセンス方向に組み込まれているプラスミドを、pREP8/AS/GTと称した(図4参照)。

(3) 導入用遺伝子断片の調製

さらに、遺伝子導入のための直鎖状断片とするために、大腸菌JM109/pREP8/AS/GT株をLB培地で大量培養した後に、プラスミド調製を行った。さらに、得られたプラスミドをCsCl密度勾配遠心法により精製した。精製したプラスミド10 μ gを、制限酵素XbaIとPstIで消化後、この断片をLMPゲル電気泳動及びWizardシステムで精製・分離し、AS/GT遺伝子導入用断片とした。この断片の構築模式図を図5に示す。

(実施例3)

相同組換え用遺伝子を含むプラスミド(pREP9/GT/FT)の構築及び導入用遺伝子断片(pGT/FT)の調製

以下、マウスの例を示すがブタにおいても基本的な考え方は同じである。

(1) pREP9/GT3-4の構築

以下、pREP9/GT3-4の構築を図6に基づいて説明する。

既報(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(1989), pp. 8227-8231)のマウスのGT[EC2. 4. 1. 151]の配列に基づいてエキソン3から4までの部分をPCR法にて抽出するために、エキソン3内のセンスプライマーとして制限酵素KpnIの切断部位をつけたプライマー(p/Aとする)、又アンチセンスプライマーとしてエキソン4内のスタートコドンの部位に制限酵素SspIの切断部位を含み、その下流に制限酵素HindIIIの切断部位をつけたプライマー(p/B)を合成した。

これらのプライマーp/A及びp/Bを用いてPCR法を施行し、得られた断片を、制限酵素KpnI及びHindIIIで切断した後、精製・分離し、これをGT3-4と称した。

一方、発現ベクターであるpREP9 (Invitrogen社) を制限酵素BamHIで切断し、T4DNAポリメラーゼによりその断端を平滑にし、T4DNAリガーゼによりself-ligationし、制限酵素BamHIの切断部位が欠失した発現ベクターを、pREP9/ΔBamHIと称した。

これを更に制限酵素DraIIIで切断し、T4DNAポリメラーゼによりその断端を平滑にし、T4DNAリガーゼによりself-ligationし、制限酵素DraIIIの切断部位が欠失した発現ベクターを、pREP9/ΔBamHI/ΔDraIIIと称した。このベクターを制限酵素KpnI及びHindIIIで切断し、上記GT3-4を挿入したプラスミドをpREP9/GT3-4と称した。

(2) pREP9/GT3-4/FT/ΔSspI/ΔDraIIIの構築

以下、pREP9/GT3-4/FT/ΔSspI/ΔDraIIIの構築を図7に基づいて説明する。

ヒトFT (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(1990), pp6674-6678) の配列に基づき、そのスタートコドンとストップコドンを含む発現部位をPCR法にて抽出するために、スタートコドンを含む5'側のセンスプライマー(p/C)には制限酵素NheIとDraIII切断部位を、この順で付けた。

一方、FTのストップコドンを含むアンチセンスプライマー(p/D)にはその3'側に制限酵素XhoI切断部位を付けた。これらのプライマーを用いてPCR法を施行し、得られた断片を制限酵素NheI及びXhoIで切断し、pREP9/GT3-4を制限酵素NheI及びXhoIで切断したプラスミドに挿入する。これをpREP9/GT3-4/FTと称した。

このプラスミドpREP/GT3-4/FTを制限酵素SspI及びDraIIIで切断すると平滑末端が生成された。

ここでT4 DNAリガーゼにて処理するとself-ligationにより両者末端が連結し、GTの発現開始部位にFTc DNAの発現開始部位が位置された。

このプラスミドをpREP9/GT3-4/FT/ Δ SspI/ Δ DraIIIと称した。以上に於いてこれら制限酵素KpnI、HindIII、SspI、NheI、DraIII、及びXhoIがいずれもエキソン3からエキソン4までの断片及びFTc DNAの発現部位の断片を切断しないことが既に確かめられている。

(3) 導入用遺伝子断片pGT/FTの調製

以下、pGT/FTの調製について図7及び図8に基づいて説明する。

pREP9のpolyAの3'側を含みかつ制限酵素BamHI切断部位を含む形でアンチセンスプライマー(p/E)を合成し、これとセンスプライマー(p/A)とを用いて、pREP9/GT3-4/FT/ Δ SspI/ Δ DraIIIに対し、PCR法を施行し、得られた断片を制限酵素KpnI及びBamHIで切断して精製・分離し、得られた断片をGT3-4/FT/polyAと称した(図7参照)。

一方、発現ベクターpREP9を制限酵素KpnIとBamHIで切断し、上記の断片GT3-4/FT/polyAを挿入した。これをpREP9/GT3-4/FT/polyAと称した。

GTのエキソン4からエキソン6までの部分を、センスプライマー(p/F)、アンチセンスプライマー(p/G)とも制限酵素BamHIの切断部位を付け、PCR法にて抽出し、この断片を制限酵素BamHIで切断し、得られた断片を、制限酵素BamHIで開列したプラスミドpREP9/GT3-4/FT/polyAに挿入した(BamHIが、GT3-4、FT、polyA及びT4-7を切断しないことは既に確かめられている)。

得られたプラスミドをpREP9/GT3-4/FT/polyA/GT4-6、或いは簡単に、pREP9/GT/FTと称した。

このプラスミドに対し、プライマー p/A 及び p/G を用いて PCR 法を施行した。精製後得られた断片を受精卵への導入用断片とし、GT 3-4/FT/poly A/GT 4-6、或いは簡単に pGT/FT と称した。

このようにして作成した導入用遺伝子断片は、GT の染色体の遺伝子と相同性が高く、相同組み換えを起こすことが期待される。相同組み換えを起こした場合は、GT の代わりに FT が発現するのでその個体 (Fo) は GT も FT も発現する。しかし交配を 1、2 世代行くと、メンデルの法則により、FT のみを持った個体を得ることが出来る。この個体こそが、非霊長類哺乳動物に特有な抗原を持たずに高等霊長類特有の抗原を持つに至った、形質転換動物である。マウスの GT とブタの GT とではホモロジーが高いのでマウスの GT に基づいた相同組み換え遺伝子をブタに適用することができる。

(実施例 4)

導入用遺伝子断片 (pMAM/FT 及び pREP8/AS/GT) のブタ受精卵への注入及びその受精卵の移植

(1) 導入用遺伝子断片 (pMAM/FT 及び pREP8/GT) のブタ受精卵への注入

実験動物として家畜豚を用いた。受精卵提供用のブタとして Landrace と White Yorkshire の交配豚で、生後約 6 ヶ月の、まだ自然発情を来す前の雌ブタを用いた。この雌ブタに排卵誘発剤 pMS (妊馬血清、シグマ社製、G4877) 及び hCG (ヒト絨毛ゴナドトロピン、シグマ社製、CG5) を注射し、Duroc 系の成熟雄ブタから採取した精液により人工受精を行い、卵管を M2 培地で灌流することにより受精卵を採取した。これらの受精卵の前核は脂肪滴に覆われているために直視出来ないため、受精卵を 10000g で 10 分間遠心することにより、脂肪滴と前核を分離し、微分干渉顕微鏡で直視下においた。

受精卵への遺伝子の注入に於いては、マウス受精卵に於ける遺伝子導入の既報 (Hogan, et al., In manipulating the Mouse Embryo., Cold Spring Harbor

Laboratory Press. 1986、Pinkert. et al., Transgenic animal, technology., Academic press, Inc. 1994)に記載されているマイクロインジェクション法を、ブタ受精卵に適用した。即ち、培養液中で受精卵を保持用ガラスピペットで固定後、微小ガラスピペットを用いて導入用遺伝子断片の溶液 2 p l を雄性前核に注入した。

2種類の遺伝子導入用断片を含む溶液は、これらの導入用断片をTE緩衝液(0.25mM EDTA、5mM Tris(pH7.4))に懸濁して、それぞれ1.0 μ g/mlになるように調製したものを用いた。

(2) 遺伝子注入をした受精卵の移植

注入操作後、CO₂ インキュベーター内にて、M2培地で2～3時間培養後、受精卵を発情している雌成熟豚の卵管へ移植した。移植は、全身麻酔下にて開腹後、卵管内移植により行った。卵管移植後分娩満期まで飼育し、産仔を得た。

なお、遺伝子注入した受精卵は、速やかに移植されるのが好ましい。

(実施例5)

遺伝子導入ブタに於ける導入遺伝子の同定

分娩後約1週目に、得られた仔ブタの尾部の先端部分約1cmを切断採取した。尾部の細胞より高分子DNAを抽出・精製した後、サザンブロッティング法及びフィルターハイブリダイゼーション法によって、導入した遺伝子断片がブタの染色体に組み込まれているかを調べた。即ち、制限酵素EcoRI とBamHI で完全に消化させた10 μ gの高分子DNAを1%アガロースゲル電気泳動した後、ナイロンフィルター(HybondN, Amersham)にDNAを転写した。フィルターは風乾後、UV照射を行いDNAを固定させて、フィルターハイブリダイゼーションに供した。なお、プローブとして、pMAM/FTを制限酵素Cla I とNhe I で完全に消化させた断片をFT用に用いた。

これらの結果を下記表1に示した。計19回の実験で550個の受精卵に遺伝子注入を行い、同数を19頭のレシピエントに移植した。この結果7頭が妊娠し、

27頭の仔ブタを分娩した。これらのうち、サザンブロッティング法及びフィルターハイブリダイゼーション法によって、FTに関して1頭が陽性であった。なお、遺伝子導入していないコントロールブタ15頭に対しても同様の検索を行ったが、いずれも陰性であった。

【表1】

導入遺伝子	移植胚数	生存胎仔数	遺伝子導入ブタ
FT	550	27	1

(実施例6)

導入遺伝子の発現の確認

遺伝子導入が確認されている仔ブタの尾部の先端を約1cm切断し、また血液を採取し、導入遺伝子発現の検出の試料とした。採取した尾部よりAGPC法(Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Method)を用いて、全RNAを分離した。次にこの全RNAを使ったRT-PCR法によって、FT遺伝子の発現の解析を行った。

即ち、全RNAから逆転写酵素によってcDNAを合成し、前述のFT遺伝子抽出のために用いたプライマーを用いてPCR法を施行した。その結果、27頭中1頭が陽性と判定された。すなわち、導入したFT遺伝子がmRNAに翻訳され、FTの酵素タンパク質を産生していることを確認した。なお、遺伝子導入していないコントロールブタ15頭に対しても同様の検索を行ったが、いずれも陰性であった。

(実施例7)

実施例6で陽性と判定された、即ちFTの蛋白質を産生していると考えられる

仔ブタから血液を採取し、遠心後、血球を分離し、蛍光抗体を使ったF I T C法でブタ血球を染色した。一方、コントロールブタ（遺伝子導入していないブタ）からも血液を採取し、同様に染色した。

即ち、一次抗体として抗H型抗体を、2次抗体として蛍光色素がラベルしてあるマウスγグロブリン（F(ab)₂）を用いた。この結果、実施例6の陽性の仔ブタは陽性と判定された。一方、コントロールブタのそれは全て陰性だった。即ち、導入されたF Tがブタ細胞の中で正しく機能していることが確かめられた。

（実施例8）

ブタの腎由来の細胞系P K 1 5にpMAM/F Tを感染させたコロニーを選択し、⁵¹C rを加えた培養液中にて、一定時間培養し、その後健康な成人ヒト血液（A、B、O、A Bの4つの血液型を含む）から採取した血漿を加えることにより、⁵¹C rリリースアッセイを行った。

この結果、図9に示すように、24時間経過の後、放出された⁵¹C rを測定した。その結果、コントロールブタの血液はほぼ100%細胞が破壊されたのが観察されたが、F Tを導入したブタの細胞は24時間経っても細胞破壊は10%以下しか観測されなかった。

このように、ブタ細胞にF Tを導入することによりいわゆる血液型が転換され、その結果ヒトのO型と同じH型物質が生成されることになり、ヒトが持つブタに対する自然抗体と抗原抗体反応を形成しないか、あるいは抗原抗体反応を形成しても低頻度であることが示された。

(実施例 9)

相同組換え用遺伝子を含むプラスミド(pGT/FT-2)の構築及び導入用遺伝子断片(L-GT/FT)の調製

以下、マウスの例を示すがブタにおいても基本的な考え型は同じである。

(1) フラグメントA(fragment A)の構築

以下、フラグメントA(fragment A)の構築を図10に基づいて説明する。

既報(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86(1989), pp.8227-8231)のマウスのGT[EC2.4.1.151]の配列に基づいてエキソン2からエキソン3までの部分をPCR法にて抽出するために、エキソン2の核酸配列に基づいてプライマーA(primer A)[配列番号3]を、又エキソン3の核酸配列に基づいてプライマーB(primer B)[配列番号4]を合成した。これらのプライマーとTaKaRa LA PCR Kit Ver.2 (宝酒造; 以下、単にLA PCRと略す) とを用いて、エキソン2からエキソン3までの部分のおよそ10 kbpを増幅した。得られた断片を精製分離した後これを鋳型にしてプライマーA (primer A)とプライマー(primer B')[配列番号5]を用いて同社指定のマニュアルに従ってLA PCRを施行した(以下プラスミドへの組み込みに際しては各製造社指定の方法により行うものとする)。プライマーB'(primer B')には制限酵素Sal Iの切断部位を含む。得られた断片を精製分離した後、これをプラスミド(pGEM-T; Promega社)に組み込み、これをプラスミドA(plasmid A)と称した。これを制限酵素Sph Iを含む種々の制限酵素で切断して、エキソン3の上流約4.8kbpの部位に制限酵素Sph Iの切断部位が1箇所存在することが判明した。そこでプラスミドAを制限酵素Sph Iと制限酵素Sal Iとで切断し、約4.8kbpの断片を得た。これを精製分離した後、T4 DNA polymerase (宝酒造)を用いて上記断片を平滑末端にした。これを断片A(fragment A)と称した。

(2) フラグメントB(fragment B)の構築

以下、フラグメントB(fragment B)の構築を図11に基づいて説明する。

既報(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86(1989), pp.8227-8231)のマウスのGT[EC2.4.1.151]の配列に基づいてエキソン4からエキソン6までの部分をPCR法にて抽出するために、エキソン4の核酸配列に基づいてプライマーC(primer C)[配列番号6]を、又エキソン6の核酸配列に基づいてプライマーD(primer D)[配列番号7]を合成した。これらのプライマーとLA-PCR

とを用いて、エキソン 4 からエキソン 6 までの部分のおよそ 7 kbp を増幅した。得られた断片を精製分離した後、

これをプラスミド pGEM-T (Promega 社) に組み込み、これをプラスミド B (plasmid B) と称した。これを制限酵素 Nco I を含む種々の制限酵素で切断して、上記断片に制限酵素 Nco I の切断部位が一箇所存在することが判明した。又制限酵素 Sac II を含む種々の制限酵素で切断して、も上記断片に制限酵素 Sac II の切断部位が一箇所も存在せず、プラスミド B (plasmid B) に存在する制限酵素 Sac II の切断部位はプラスミド pGEM-T (Promega 社) の 5' 側のクローニング部位のみであることが判明した。そこでプラスミド B を制限酵素 Sac II と Nco I とで切断し、約 3.9 kbp の断片を得た。これを精製分離した後、T4 DNA polymerase (宝酒造) を用いて上記断片を平滑末端にした。この断片に対し、ヌクレオチドの T で始まる Sac II リンカー (New England Biolabs, Inc.) を付加した。これを断片 B (fragment B) と称した。

(2) プラスミド C (plasmid C) の構築

以下、プラスミド C (plasmid C) の構築を図 12 に基づいて説明する。

既報 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990), pp. 6674-6678) のヒトの FT [EC2.4.1.96] の DNA 配列に基づいてエキソン 1 からエキソン 2 までの部分の cDNA を RT-PCR 法にて抽出するために、プライマー E (primer E) [配列番号 8] とプライマー F (primer F) [配列番号 9] を合成した。この cDNA の合成の方法については上記実施例 1 に記載した通りである。これらプライマーを用いて施行された RT-PCR 法により得られた断片 (これを断片 C と称する) には FT の発現のためのスタートコドンとストップコドンが含まれている。又スタートコドンの上流には制限酵素 Sal I の切断部位が存在している。

次に、この断片 (fragment C) を、発現ベクター pCR3 (Invitrogen 社) に組み込み、これをプラスミド C (plasmid C) と称した。

(3) プラスミド D (plasmid D) の構築

以下、プラスミド D (plasmid D) の構築を図 12 に基づいて説明する。

上記発現ベクター pCR3 の 1113 番のヌクレオチドの部位に、即ち pCR3 の poly A の部位のすぐ下流に制限酵素 Afl III が唯一存在し、又この制限酵素は FT を含む断片 C (fragment C) を切断しないことが確かめられている。そこでプラスミド C (plasmid C) を制限酵素 Afl III で

切断した。これを前記T4 DNA polymerase (宝酒造)を用いて上記断片を平滑末端にした。次にこの断片に前記Sac IIリンカー(New England Biolabs, Inc.)を付加した。これを制限酵素Sac IIで切断した後、これを前記T4 DNA ligase (宝酒造)を用いてself-ligation 処理した。この結果制限酵素Sac IIのすぐ下流に新たに制限酵素Afl IIIの切断部位が出現する。この断片をプラスミドD(plasmid D)と称した。

(4) プラスミドE(plasmid E)の構築

以下、プラスミドE(plasmid E)の構築を図13に基づいて説明する。

上記プラスミドD(plasmid D)を制限酵素Sac II で処理し、これを脱リン化酵素(CIAP; 宝酒造)で脱リン化処理した後、これに、制限酵素Sac II で処理した断片B(fragment B)を前記T4 DNA ligase (宝酒造)を用いてligation 処理した。これをプラスミドE(plasmid E)と称する。

(5) プラスミドF(plasmid F)の構築

以下、プラスミドF(plasmid F)の構築を図14に基づいて説明する。

前記プラスミドE(plasmid E)を制限酵素Sal Iで切断し平滑化処理した後、前記T4 DNA ligase (宝酒造)を用いて断片A(fragment A)とligation 処理した。これをプラスミドF(plasmid F)と称した。

(6) コンストラクトの構築

以下、コンストラクトの構築を図14に基づいて説明する。

上記プラスミドF(plasmid F)を制限酵素Sal I 及Afl IIIで切断した。これにより約10 kbpの長さの断片を得た。これを前記のように分離精製し、濃度を5.0 µg/µlに調整し、遺伝子導入用の遺伝子断片として、L-GT/FTと称した。

(7) コンストラクトの特徴

以下、このコンストラクトの特徴を述べる。

それはまず第一に、このコンストラクトは、GTの遺伝子の翻訳開始コードを含む配列部分を欠失する形で変異配列が挿入されていることである。第2に、この挿入された配列が、FTの遺伝子をコードする翻訳部分(翻訳開始コードおよび翻訳停止コードを含む)をすべて含んでいることである。第3に、前記挿入された配列が、FTの翻訳部分の3'側にターミネーターを含む点である。第4に、前記挿入された配列が、GTの遺伝子の翻訳開

始コードの5'側の非翻訳部分と結合していることである。第5に、前記挿入された配列の部分の長さが、内在するGTの遺伝子の欠失する部分の長さとはほぼ同じであること、言い換えればコンストラクトの配列の長さが、内在するGTの遺伝子の中の相同組み換えを起こす部分の長さとはほぼ同じであることである。

これら特徴の結果、比較的、相同組み換えが起こりやすく、かつ相同組み換えが起きた場合、GTの遺伝子は翻訳開始コードを欠くためにGTが発現せず、かつFTの遺伝子が翻訳され発現することになる。

(実施例10)

導入用遺伝子断片 (L-GT/FT) のマウス細胞への導入

マウスの培養細胞L-9 29を直径3cmの培養皿内でおよそ2mlの血清培地 (FCS加RPMI)の中でおよそ 1.0×10^5 個の細胞が認められるようになるまで培養し、この日を第1日目とすると、第2日目には無血清培地に替え、約3時間の後に次に述べる溶液を上記培養皿に添加した。即ち、A液として、7 μ lのDMEM溶液に前記遺伝子断片L-GT/FTを2 μ l、及び前記pMAMneo(1.0 μ g/ μ l)を1 μ l加えた混合液を用意した。B液として、5 μ lのDMEM溶液に、遺伝子導入用合成脂質であるリポフェクチン (Gibco社) 5 μ lを加えた混合溶液を用意した。この混合溶液Aを混合溶液Bに加えた。室温にて約15分培養し、DMEM溶液を30 μ l加え、静かに混合した上で、上記マウスの培養細胞L-9 29が培養されている培養皿へ添加した。第3日目の朝には10% FBS加PRMI溶液を1.5ml加え、次の朝まで培養した。第4日目の朝には培養液をすべて2mlの10% FBS加PRMI溶液に置き換え、その後更に2日培養した。第6日目にはバサージュして直径10cmの培養皿にすべての細胞を移し、皿に1日培養した。第7日目には、G418を最終濃度300 μ g/mlになるように調整した10% FBS加PRMI溶液10mlで培養液を置き換えた加えた。この後さらに7日培養し、前記G418加10% FBS加PRMI溶液10mlで培養液を置き換えた。

(実施例11)

遺伝子導入マウス細胞に於ける導入遺伝子の同定

こうした結果、培養皿の中に187個のコロニーを得た。

得られたコロニーをバサージュして更に増殖させてから細胞を抽出した。前記方法にてDNAを抽出できた細胞群が152個だった。これらのDNAを制限酵素Sph Iと Bgl II で切断した。前記方法によりSouthern blotting を行った。probeとしてFTのcDNAを用いたSouthern blotting 結果、142個の細胞群が陽性だった(図16A)。これらのうち、図15に示す様に本来存在しない外来遺伝子FTの配列の中から選んだプライマーG[配列番号10]及H[配列番号11]を用い前記の様にLA-PCRを施行した。即ち、同所性組み換え(homologous recombination)が起こっているときにだけプライマーAとプライマーGによるPCRにおいて約10 kbpの長さのバンド、及プライマーDとプライマーHによるPCRにおいて約7 kbpの長さのバンドを得る。実際上記142個の細胞群のうち3個の細胞群においてこれらのLA-PCRにおいて陽性だった(図16Bおよび16C)。同所性組み換えが起こっている時以外ではこれらのバンドが検出されないことは明らかである(図16Bおよび16C(実施例12))

導入遺伝子の発現の確認

前記の遺伝子導入細胞を更に培養し、全RNAを抽出した。これを基に前記プライマーE及Fを用いてRT-PCRを施行した。この結果、前記3細胞群の内3細胞群に於いてRT-PCR上陽性であった(図16D)。また、蛍光標識がラベルされているレクチン(UEA-I; EY laboratories)を用いて、上記外来遺伝子細胞群および非導入細胞群を染色し、フローサイトメトリーにて前記H抗原の発現を確認した(図16E およびF)。なお、図16EのL929/Neo/UEA-Iとは、ネオマイシン耐性遺伝子を導入したマウスL929細胞群を前記レクチンUEA-Iを用いてH抗原の発現の程度を測定したことを示す。同様に図16FのL929/FT/UEA-Iとは、前記外来遺伝子L-GT/FTを導入したマウスL929細胞群を前記レクチンUEA-Iを用いてH抗原の発現の程度を測定したことを示す。

これらの結果は明らかに外来導入遺伝子L-GT/FTがマウスの体細胞の中に同所性に組み換えられていること、かつ導入されたFTが発現していることを意味している。このことは、もしこの導入外来用遺伝子L-GT/FTが生殖細胞系列に導入されていれば、しかるべき継代を経て、外来遺伝子L-GT/FTに関してホモの状態になりうること、すなわちG抗原の代わりにH抗原を発現している個体の出現が期待できることを示している。

(実施例 13)

導入用遺伝子断片 (pGT/FT) のマウス細胞への導入、その同定およびその発現の確認

導入用遺伝子断片 (pGT/FT) のマウス細胞への導入については上記実施例 10 に準じて行った。その同定についても上記実施例 11 に準じて行った。

こうした結果、培養皿の中に 361 個のコロニーを得た。

得られたコロニーをバサージュして更に増殖させてから細胞を抽出した。前記方法にて DNA を抽出できた細胞群が 285 個だった。これらの DNA を鋳型にしてプライマー (P/C) および (p/D) を用いて PCR を施行した。その結果、137 個の細胞群が陽性だった (図 17A)。これらのうち、本来存在しない外来遺伝子 FT の配列の中から選んだプライマーおよび内在する GT にかかわる部分から選んだプライマーを用いて PCR を施行した。

上記 137 個の細胞群のうち 1 個の細胞群において陽性のバンドを検出した (図 17B および 17C)。

次にこの細胞群から全 RNA を抽出し、RT-PCR を施行した。その結果、陽性のバンドを得た (図 17D)。次に前記のレクチンを用いて前記の細胞の H 抗原の発現についてフローサイトメトリーを用いて検定し、陽性の結果を得た (図 17E および 図 17F)。

なお、この発明は、その本質的特性から逸脱することなく数多くの形式のものとして具体化することができるから、これらの実施態様はもっぱら説明上のもので制約的なものではない。また、この発明の範囲は、請求の範囲以外の記載によるものでなく、請求の範囲によって限定するものであるから、請求の範囲の要件内のあらゆる変更、またはその要件に対する均等物は請求の範囲に包含されるものである。

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人：小池 千裕

(ii) 発明の名称： 外来遺伝子の導入により高等霊長類の抗原型を発現した非₂霊長哺乳類の形質転換動物及びその作出方法

(iii) 配列の数： 1 1

(iv) 連絡先住所：

(A) 宛て名：小池 千裕

(B) 通り：八竜町 1 - 3 0

(C) 市：名古屋市

(D) 州：愛知県

(E) 国：日本

(F) 郵便番号： 4 6 2

(v) コンピュータ読み取り可能形式

(A) 媒体方式：

(B) コンピュータ：

(C) 動作システム：

(D) ソフトウェア：

(vi) 現行適用データ

(A) 適用番号：

(B) ファイル日：

(C) 分類：

(vii) 事前適用データ

(A) 適用番号：

(B) ファイル日：

(C) 分類：

(viii) アトニー／エージェント情報

(A) 氏名：

(B) 登録番号 :

(C) 参照／事件番号 :

(ix) 通信手段情報

(A) 電話 : 0 5 2 / 9 1 2 - 7 0 6 2

(B) ファクシミリ : 0 5 2 / 9 1 2 - 7 0 6 2

(C) テレックス :

(2) 配列番号 1 (SEQ ID NO:1)に関する情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1174

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA to mRNA

(A) 特徴: $\alpha(1, 2)$ フコシルトランスフェラーゼ

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(x) 刊行物情報:

(A) 著者: Larsen, R. D.

Ernest, L. K.

Nair, R. P.

Lowe, J. B.

(B) 題名: Molecular cloning, sequence, and expression of a Human GDP-L-fucose:-D-galactoside 2- α -L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen.

(C) 雑誌名: Proceedings of the National Academy of Science, USA

(D) 巻数: 87

(F) 頁数: 6674-6678

(G) 日付: SEP-1990

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 1:

CAAGCAGCTC GGCC

14

ATG TGG CTC CGG AGC CAT CGT CAG CTC TGC CTG GCC TTC CTG
 Met Trp Leu Arg Ser His Arg Gln Leu Cys Leu Ala Phe Leu

56

1

5

10

CTA GTC TGT GTC CTC TCT GTA ATC TTC TTC CTC CAT ATC CAT Leu Val Cys Val Leu Ser Val Ile Phe Phe Leu His Ile His 15 20 25	98
CAA GAC AGC TTT CCA CAT GGC CTA GGC CTG TCG ATC CTG TGT Gln Asp Ser Phe Pro His Gly Leu Gly Leu Ser Ile Leu Cys 30 35 40	140
CCA GAC CGC CGC CTG GTG ACA CCC CCA GTG GCC ATC TTC TGC Pro Asp Arg Arg Leu Val Thr Pro Pro Val Ala Ile Phe Cys 45 50 55	182
CTG CCG GGT ACT GCG ATG GGC CCC AAC GCC TCC TCT TCC TGT Leu Pro Gly Thr Ala Met Gly Pro Asn Ala Ser Ser Ser Cys 60 65 70	224
CCC CAG CAC CCT GCT TCC CTC TCC GGC ACC TGG ACT GTC TAC Pro Gln His Pro Ala Ser Leu Ser Gly Thr Trp Thr Val Tyr 75 80	266
CCC AAT GGC CGG TTT GGT AAT CAG ATG GGA CAG TAT GCC ACG Pro Asn Gly Arg Phe Gly Asn Gln Met Gly Gln Tyr Ala Thr 85 90 95	308
CTG CTG GCT CTG GCC CAG CTC AAC GGC CGC CGG GCC TTT ATC Leu Leu Ala Leu Ala Gln Leu Asn Gly Arg Arg Ala Phe Ile 100 105 110	350
CTG CCT GCC ATG CAT GCC GCC CTG GCC CCG GTA TTC CGC ATC Leu Pro Ala Met His Ala Ala Leu Ala Pro Val Phe Arg Ile 115 120 125	392
ACC CTG CCC GTG CTG GCC CCA GAA GTG GAC AGC CGC ACG CCG Thr Leu Pro Val Leu Ala Pro Glu Val Asp Ser Arg Thr Pro 130 135 140	434
TGG CGG GAG CTG CAG CTT CAC GAC TGG ATG TCG GAG GAG TAC Trp Arg Glu Leu Gln Leu His Asp Trp Met Ser Glu Glu Tyr 145 150	476
GCG GAC TTG AGA GAT CCT TTC CTG AAG CTC TCT GGC TTC CCC Ala Asp Leu Arg Asp Pro Phe Leu Lys Leu Ser Gly Phe Pro 155 160 165	518
TGC TCT TGG ACT TTC TTC CAC CAT CTC CGG GAA CAG ATC CGC Cys Ser Trp Thr Phe Phe His His Leu Arg Glu Gln Ile Arg 170 175 180	560
AGA GAG TTC ACC CTG CAC GAC CAC CTT CGG GAA GAG GCG CAG Arg Glu Phe Thr Leu His Asp His Leu Arg Glu Glu Ala Gln 185 190 195	602
AGT GTG CTG GGT CAG CTC CGC CTG GGC CGC ACA GGG GAC CGC Ser Val Leu Gly Gln Leu Arg Leu Gly Arg Thr Gly Asp Arg 200 205 210	644

CCG CGC ACC TTT GTC GGC GTC CAC GTG CGC CGT GGG GAC TAT Pro Arg Thr Phe Val Gly Val His Val Arg Arg Gly Asp Tyr 215 220	686
CTG CAG GTT ATG CCT CAG CGC TGG AAG GGT GTG GTG GGC GAC Leu Gln Val Met Pro Gln Arg Trp Lys Gly Val Val Gly Asp 225 230 235	728
AGC GCC TAC CTC CGG CAG GCC ATG GAC TGG TTC CGG GCA CGG Ser Ala Tyr Leu Arg Gln Ala Met Asp Trp Phe Arg Ala Arg 240 245 250	770
CAC GAA GCC CCC GTT TTC GTG GTC ACC AGC AAC GGC ATG GAG His Glu Ala Pro Val Phe Val Val Thr Ser Asn Gly Met Glu 255 260 265	812
TGG TGT AAA GAA AAC ATC GAC ACC TCC CAG GGC GAT GTG ACG Trp Cys Lys Glu Asn Ile Asp Thr Ser Gln Gly Asp Val Thr 270 275 280	854
TTT GCT GGC GAT GGA CAG GAG GCT ACA CCG TGG AAA GAC TTT Phe Ala Gly Asp Gly Gln Glu Ala Thr Pro Trp Lys Asp Phe 285 290	896
GCC CTG CTC ACA CAG TGC AAC CAC ACC ATT ATG ACC ATT GGC Ala Leu Leu Thr Gln Cys Asn His Thr Ile Met Thr Ile Gly 295 300 305	938
ACC TTC GGC TTC TGG GCT GCC TAC CTG GCT GGC GGA GAC ACT Thr Phe Gly Phe Trp Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Gly Asp Thr 310 315 320	980
GTC TAC CTG GCC AAC TTC ACC CTG CCA GAC TCT GAG TTC CTG Val Tyr Leu Ala Asn Phe Thr Leu Pro Asp Ser Glu Phe Leu 325 330 335	1022
AAG ATC TTT AAG CCG GAG GCG GCC TTC CTG CCC GAG TGG GTG Lys Ile Phe Lys Pro Glu Ala Ala Phe Leu Pro Glu Trp Val 340 345 350	1064
GGC ATT AAT GCA GAC TTG TCT CCA CTC TGG ACA TTG GCT AAG Gly Ile Asn Ala Asp Leu Ser Pro Leu Trp Thr Leu Ala Lys 355 360	1106
CCT TGAGAGCCAG GGAGACTTTC TGAAGTAGCC TGATCTTTCT Pro 365	1149
AGAGCCAGCA GTACGTGGCT TCAGA	1174

(3) 配列番号 2 (SEQ ID NO:2)に関する情報

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1 4 2 8
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA to mRNA

- (A) 特徴: α (1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(x) 刊行物情報:

- (A) 著者: Mauro S. Sandrin

Paul L. Dabkowski

Margaret M. Henning

Effie Mouhtouris

Ian F. C. McKenzie

- (B) 題名: Characterization of cDNA clones for porcine
alfa(1.3)galactosyl transferase :The enzyme
generating the Gal alfa(1.3)Gal epitope

- (C) 雑誌名: XENOTRANSPLANTATION

- (D) 巻数: 1994;1

- (F) 頁数: 81-88

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 2:

CGGGGGCCAT CCCCAGCGC ACCCAGCTTC TGCCGATCAG GAGAAAATA	49
ATG AAT GTC AAA GGA AGA GTG GTT CTG TCA ATG CTG CTT GTC Met Asn Val Lys Gly Arg Val Val Leu Ser Met Leu Leu Val	91
5 10	
TCA ACT GTA ATG GTT GTG TTT TGG GAA TAC ATC AAC AGA AAC Ser Thr Val Met Val Val Phe Trp Glu Tyr Ile Asn Arg Asn	133
15 20 25	
CCA GAA GTT GGC AGC AGT GCT CAG AGG GGC TGG TGG TTT CCG Pro Glu Val Gly Ser Ser Ala Gln Arg Gly Trp Trp Phe Pro	175
30 35 40	
AGC TGG TTT AAC AAT GGG ACT CAC AGT TAC CAC GAA GAA GAA Ser Trp Phe Asn Asn Gly Thr His Ser Tyr His Glu Glu Glu	217
45 50 55	
GAC GCT ATA GGC AAC GAA AAG GAA CAA AGA AAA GAA GAC AAC Asp Ala Ile Gly Asn Glu Lys Glu Gln Arg Lys Glu Asp Asn	259
60 65 70	
AGA GGA GAG CTT CCG CTA GTG GAC TGG TTT AAT CCT GAG AAA Arg Gly Glu Leu Pro Leu Val Asp Trp Phe Asn Pro Glu Lys	301
75 80	
CGC CCA GAG GTC GTG ACC ATA ACC AGA TGG AAG GCT CCA GTG Arg Pro Glu Val Val Thr Ile Thr Arg Trp Lys Ala Pro Val	343
85 90 95	
GTA TGG GAA GGC ACT TAC AAC AGA GCC GTC TTA GAT AAT TAT Val Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Arg Ala Val Leu Asp Asn Tyr	385
100 105 110	
TAT GCC AAA CAG AAA ATT ACC GTG GGC TTG ACG GTT TTT GCT Tyr Ala Lys Gln Lys Ile Thr Val Gly Leu Thr Val Phe Ala	427
115 120 125	
GTC GGA AGA TAC ATT GAG CAT TAC TTG GAG GAG TTC TTA ATA Val Gly Arg Tyr Ile Glu His Tyr Leu Glu Glu Phe Leu Ile	469
130 135 140	
TCT GCA AAT ACA TAC TTC ATG GTT GGC CAC AAA GTC ATC TTT Ser Ala Asn Thr Tyr Phe Met Val Gly His Lys Val Ile Phe	511
145 150	
TAC ATC ATG GTG GAT GAT ATC TCC AGG ATG CCT TTG ATA GAG Tyr Ile Met Val Asp Asp Ile Ser Arg Met Pro Leu Ile Glu	553
155 160 165	
CTG GGT CCT CTG CGT TCC TTT AAA GTG TTT GAG ATC AAG TCC Leu Gly Pro Leu Arg Ser Phe Lys Val Phe Glu Ile Lys Ser	595
170 175 180	

GAG	AAG	AGG	TGG	CAA	GAC	ATC	AGC	ATG	ATG	CGC	ATG	AAG	ACC	637
Glu	Lys	Arg	Trp	Gln	Asp	Ile	Ser	Met	Met	Arg	Met	Lys	Thr	
		185					190					195		
ATC	GGG	GAG	CAC	ATC	CTG	GCC	CAC	ATC	CAG	CAC	GAG	GTG	GAC	679
Ile	Gly	Glu	His	Ile	Leu	Ala	His	Ile	Gln	His	Glu	Val	Asp	
			200					205					210	
TTC	CTC	TTC	TGC	ATT	GAC	GTG	GAT	CAG	GTC	TTC	CAA	AAC	AAC	721
Phe	Leu	Phe	Cys	Ile	Asp	Val	Asp	Gln	Val	Phe	Gln	Asn	Asn	
				215					220					
TTT	GGG	GTG	GAG	ACC	CTG	GGC	CAG	TCG	GTG	GCT	CAG	CTA	CAG	763
Phe	Gly	Val	Glu	Thr	Leu	Gly	Gln	Ser	Val	Ala	Gln	Leu	Gln	
225					230					235				
GCC	TGG	TGG	TAC	AAG	GCA	CAT	CCT	GAC	GAG	TTC	ACC	TAC	GAG	805
Ala	Trp	Trp	Tyr	Lys	Ala	His	Pro	Asp	Glu	Phe	Thr	Tyr	Glu	
	240					245					250			
AGG	CGG	AAG	GAG	TCC	GCA	GCC	TAC	ATT	CCG	TTT	GGC	CAG	GGG	847
Arg	Arg	Lys	Glu	Ser	Ala	Ala	Tyr	Ile	Pro	Phe	Gly	Gln	Gly	
		255					260					265		
GAT	TTT	TAT	TAC	CAC	GCA	GCC	ATT	TTT	GGG	GGA	ACA	CCC	ACT	889
Asp	Phe	Tyr	Tyr	His	Ala	Ala	Ile	Phe	Gly	Gly	Thr	Pro	Thr	
			270					275					280	
CAG	GTT	CTA	AAC	ATC	ACT	CAG	GAG	TGC	TTC	AAG	GGA	ATC	CTC	931
Gln	Val	Leu	Asn	Ile	Thr	Gln	Glu	Cys	Phe	Lys	Gly	Ile	Leu	
				285					290					
CAG	GAC	AAG	GAA	AAT	GAC	ATA	GAA	GCC	GAG	TGG	CAT	GAT	GAA	973
Gln	Asp	Lys	Glu	Asn	Asp	Ile	Glu	Ala	Glu	Trp	His	Asp	Glu	
295					300					305				
AGC	CAT	CTA	AAC	AAG	TAT	TTC	CTT	CTC	AAC	AAA	CCC	ACT	AAA	1015
Ser	His	Leu	Asn	Lys	Tyr	Phe	Leu	Leu	Asn	Lys	Pro	Thr	Lys	
		310				315					320			
ATC	TTA	TCC	CCA	GAA	TAC	TGC	TGG	GAT	TAT	CAT	ATA	GGC	ATG	1057
Ile	Leu	Ser	Pro	Glu	Tyr	Cys	Trp	Asp	Tyr	His	Ile	Gly	Met	
		325					330					335		

TCT GTG GAT ATT AGG ATT GTC AAG ATA GCT TGG CAG AAA AAA	1099
Ser Val Asp Ile Arg Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln Lys Lys	
340 345 350	
GAG TAT AAT TTG GTT AGA AAT AAC ATC TGACTTTAAA	1136
Glu Tyr Asn Leu Val Arg Asn Asn Ile	
355	
TTGTGCCAGC AGTTTTCTGA ATTTGAAAGA GTATTACTCT GGCTACTTCC	1186
TCAGAGAAGT AGCACTTAAT TTTAACTTTT AAAAAAATAC TAACAAAATA	1236
CCAACACAGT AAGTACATAT TATTCTTCCT TGCAACTTTG AGCCTTGTC	1286
AATGGGAGAA TGA CTCTGTA GTAATCAGAT GTAAATTCCC AATGATTTCT	1336
TATCTGCGGA ATTCCAGCTG AGCGCCGCTC GCTACCATT	1386
CCAGTTGCTC	
TGGTGTCGAC GACTCCTGGA GCGCGTCAGT ATCGGCG	1423

(4) 配列番号 3 (SEQ ID NO:3)に関する情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 38

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 1本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: その他の核酸

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(vi) 配列の記載: SEQ ID NO: 3:

GTACCTTCCT TTCCTCTGCT GAGCCCTGCC TCCTTAGG

38

(5) 配列番号 4 (SEQ ID NO:4)に関する情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 1本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: その他の核酸

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(vi) 配列の記載: SEQ ID NO: 4:

GGGGTAAGCA GATCTCTTGA GTTCAAAGTC AGC

33

(6) 配列番号 5 (SEQ ID NO:5)に関する情報

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ : 27
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : その他の核酸
- (iii) ハイボセティカル : No
- (iv) アンチセンス : No
- (vi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 5 :

CTTTAATTCC AGTCGACTGG GGTAAGC

27

(7) 配列番号6 (SEQ ID NO:6)に関する情報

- (i) 配列の特徴 :
 - (A) 長さ : 30
 - (B) 型 : 核酸
 - (C) 鎖の数 : 1本鎖
 - (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : その他の核酸
- (iii) ハイボセティカル : No
- (iv) アンチセンス : No
- (vi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 6 :

GTCAAGGGAA AAGTAATCCT GTTGATGCTG

30

(8) 配列番号7 (SEQ ID NO:7)に関する情報

- (i) 配列の特徴 :
 - (A) 長さ : 34
 - (B) 型 : 核酸
 - (C) 鎖の数 : 1本鎖

- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：その他の核酸
- (iii) ハイボセティカル：No
- (iv) アンチセンス：No
- (vi) 配列の記載：SEQ ID NO：7：

CCAGCTTGGG AACCACCAGT CCTTCTGCCA TCTG

34

(9) 配列番号 8 (SEQ ID NO:8)に関する情報

- (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：26
 - (B) 型：核酸
 - (C) 鎖の数：1本鎖
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：その他の核酸
- (iii) ハイボセティカル：No
- (iv) アンチセンス：No
- (vi) 配列の記載：SEQ ID NO：8：

ACGAAAAGCG GACTGTCGAC CTGCCA

26

(10) 配列番号9 (SEQ ID NO:9)に関する情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 1本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: その他の核酸

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(vi) 配列の記載: SEQ ID NO: 9:

CCCTGGCTCT CAAGGCTTAG CCAATGTCCA GAG

38

(11) 配列番号10 (SEQ ID NO:10)に関する情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 29

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 1本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: その他の核酸

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(vi) 配列の記載: SEQ ID NO: 10:

AGAGCTGACG ATGGCTCCGG AGCCACATG

29

(12) 配列番号 11 (SEQ ID NO:11) に関する情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 32

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 1 本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: その他の核酸

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(vi) 配列の記載: SEQ ID NO: 11:

CCACTCTGGA CATTGGCTAA GCCTTGAGAG CC

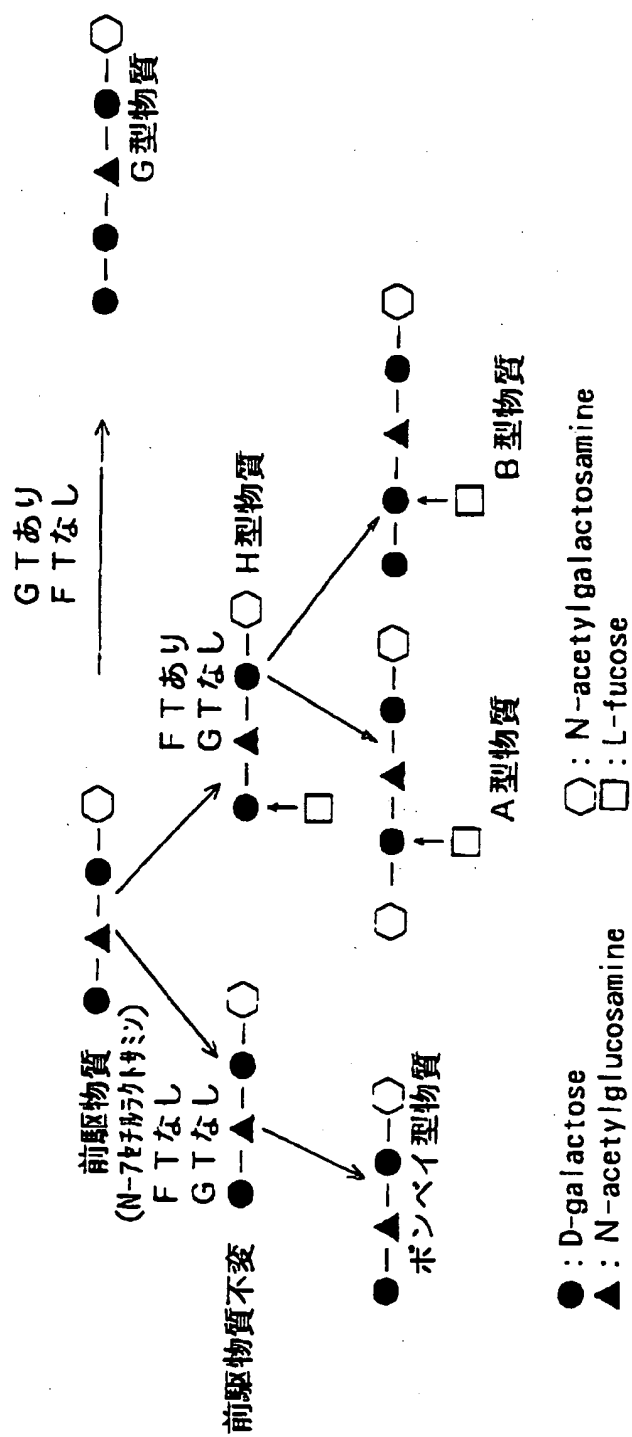
請求の範囲

1. 高等霊長類の α (1, 2) フコシルトランスフェラーゼをコードするDNA配列を含むDNA構築物が導入され、H型抗原を発現するように形質転換されていることを特徴とする非霊長哺乳類の形質転換動物。
2. 高等霊長類の α (1, 2) フコシルトランスフェラーゼをコードするDNA配列を含む第1のDNA構築物と、非霊長哺乳類の α (1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼの遺伝子に対してアンチセンスであるDNA配列を含む第2のDNA構築物とが導入され、高等霊長類のH型抗原を発現する一方、非霊長哺乳類のG型抗原を低減するように形質転換されていることを特徴とする非霊長哺乳類の形質転換動物。
3. 非霊長哺乳類の α (1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の一部に、 α (1, 2) フコシルトランスフェラーゼをコードするDNA配列を含むDNA構築物が相同組換えにより挿入され、非霊長哺乳類のG型抗原を発現することなく高等霊長類のH型抗原を発現するように形質転換されていることを特徴とする非霊長哺乳類の形質転換動物。
4. 前記非霊長哺乳類の形質転換動物がブタであることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の形質転換動物。
5. 非霊長哺乳類の α (1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の一部に、 α (1, 2) フコシルトランスフェラーゼをコードするDNA配列を含むDNA構築物が相同組換えにより挿入され、非霊長哺乳類のG型抗原を発現することなく高等霊長類のH型抗原を発現するように形質転換された非霊長哺乳類の形質転換動物から得られた移植用材料。
6. 非霊長哺乳類の α (1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の一部に、 α (1, 2) フコシルトランスフェラーゼをコードするDNA配列を含むDNA構築物を相同組換えにより挿入し、非霊長哺乳類のG型抗原を発現することなく高等霊長類のH型抗原を発現するように形質転換した非霊長哺乳類の形質転換動物の作出方法。
7. 非霊長哺乳類の組織を高等霊長類に移植する際の、高等霊長類の自然抗体と

非霊長哺乳類の抗原とによる拒絶反応を回避する方法であって、

非霊長哺乳類の $\alpha(1, 3)$ ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の一部に、 $\alpha(1, 2)$ フコシルトランスフェラーゼをコードするDNA配列を含むDNA構築物を相同組換えにより挿入して、非霊長哺乳類のG型抗原を発現することなく高等霊長類のH型抗原を発現するように形質転換した非霊長哺乳類を作出する工程と、

この工程により得られた前記非霊長哺乳類の組織を高等霊長類に移植する工程を含んだ方法。



A B H 抗原の生成

FIG. 1

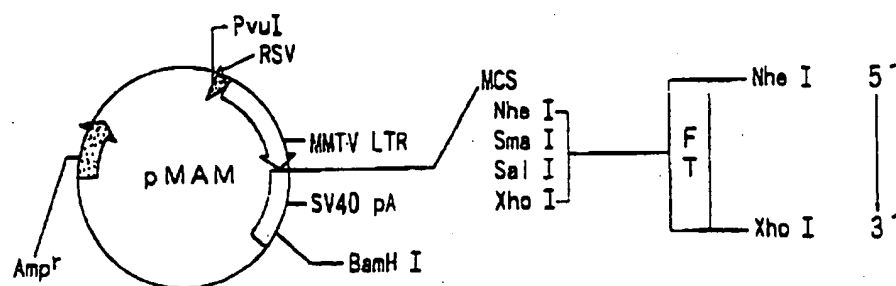


FIG. 2

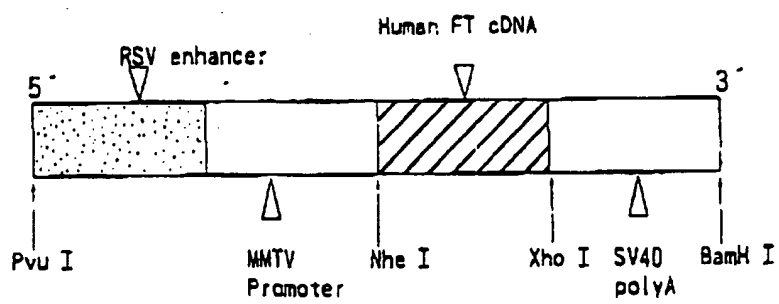


FIG. 3

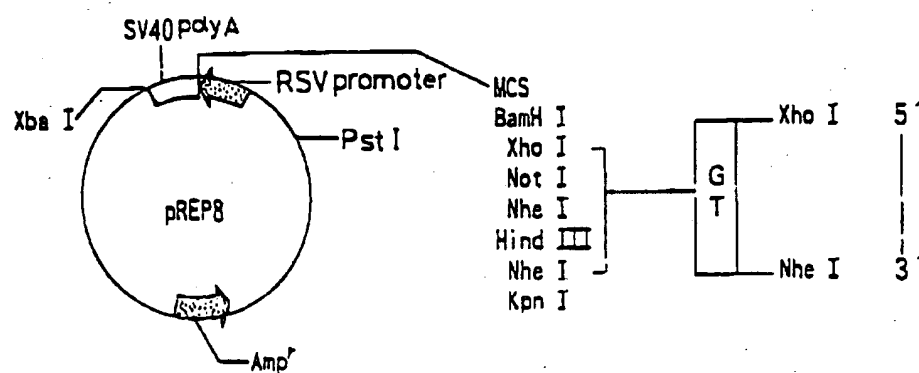


FIG.4

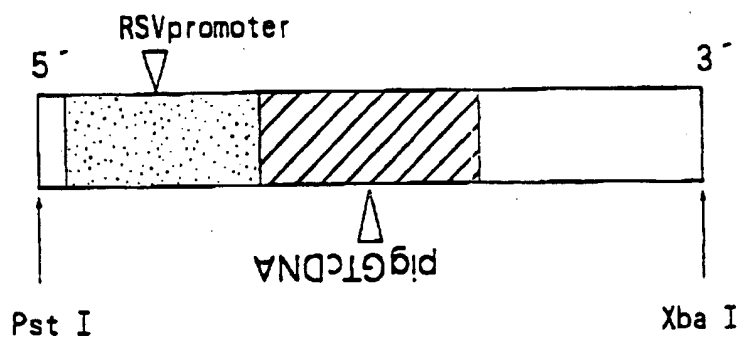


FIG.5

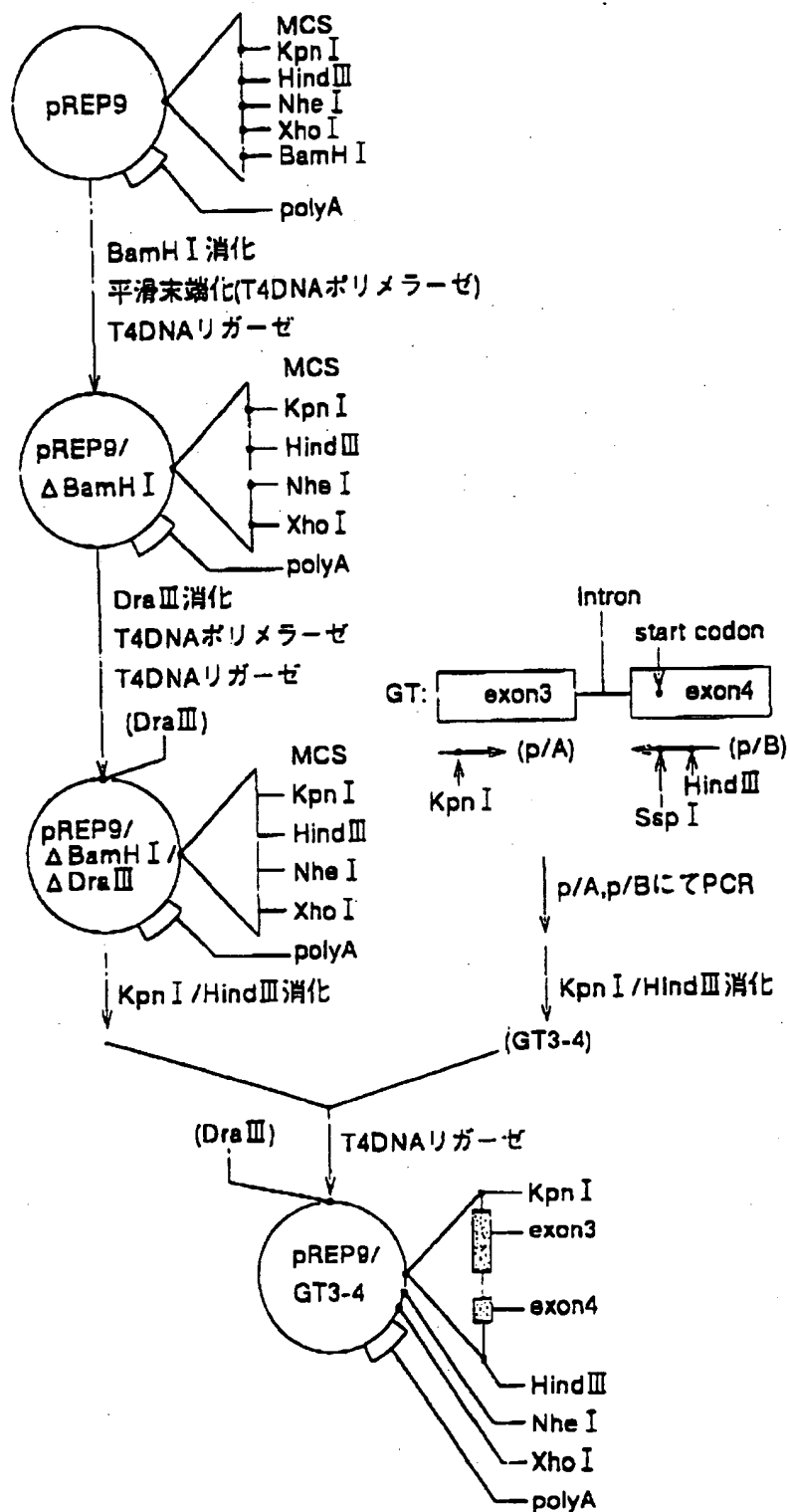


FIG. 6

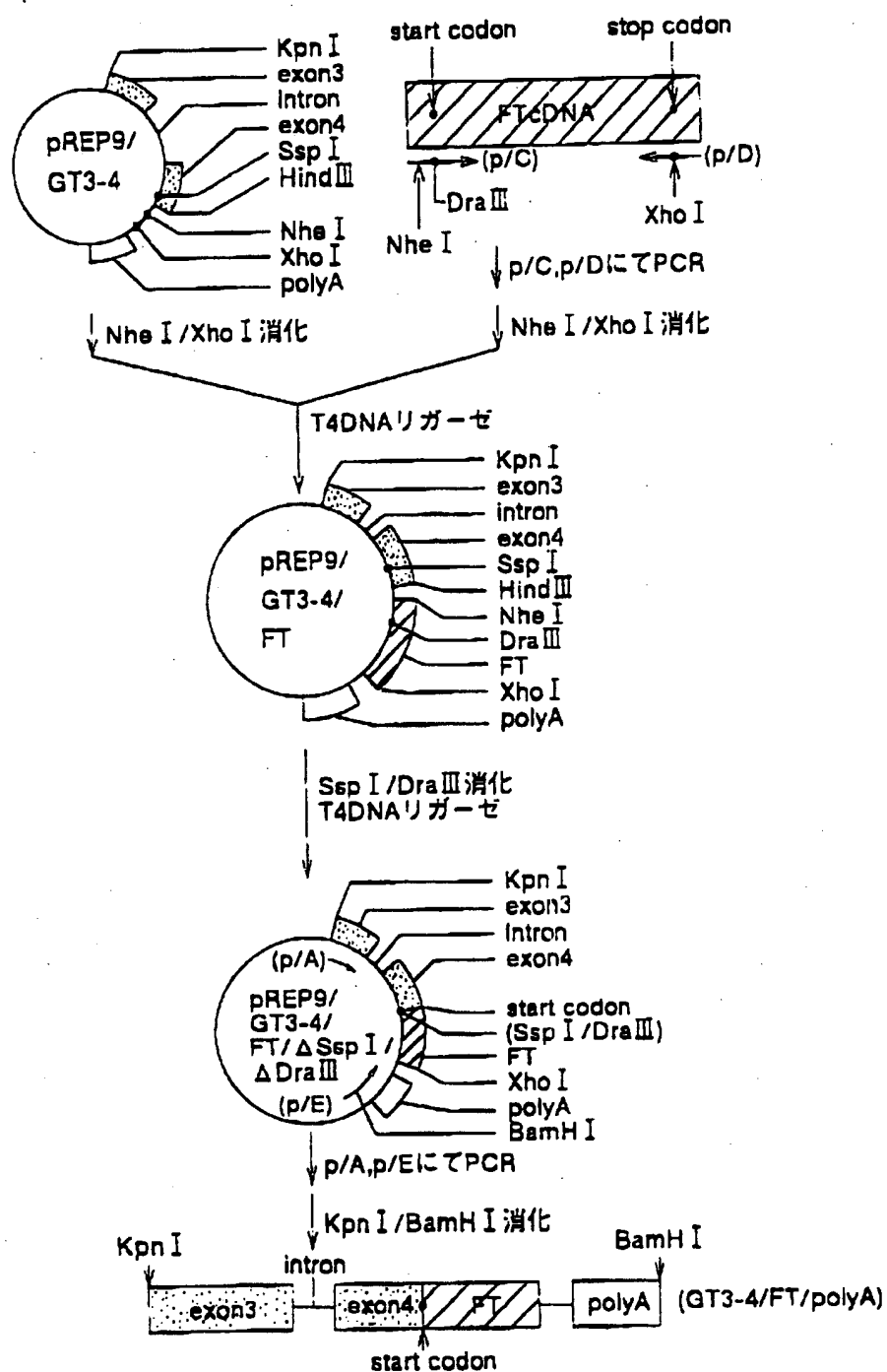


FIG.7

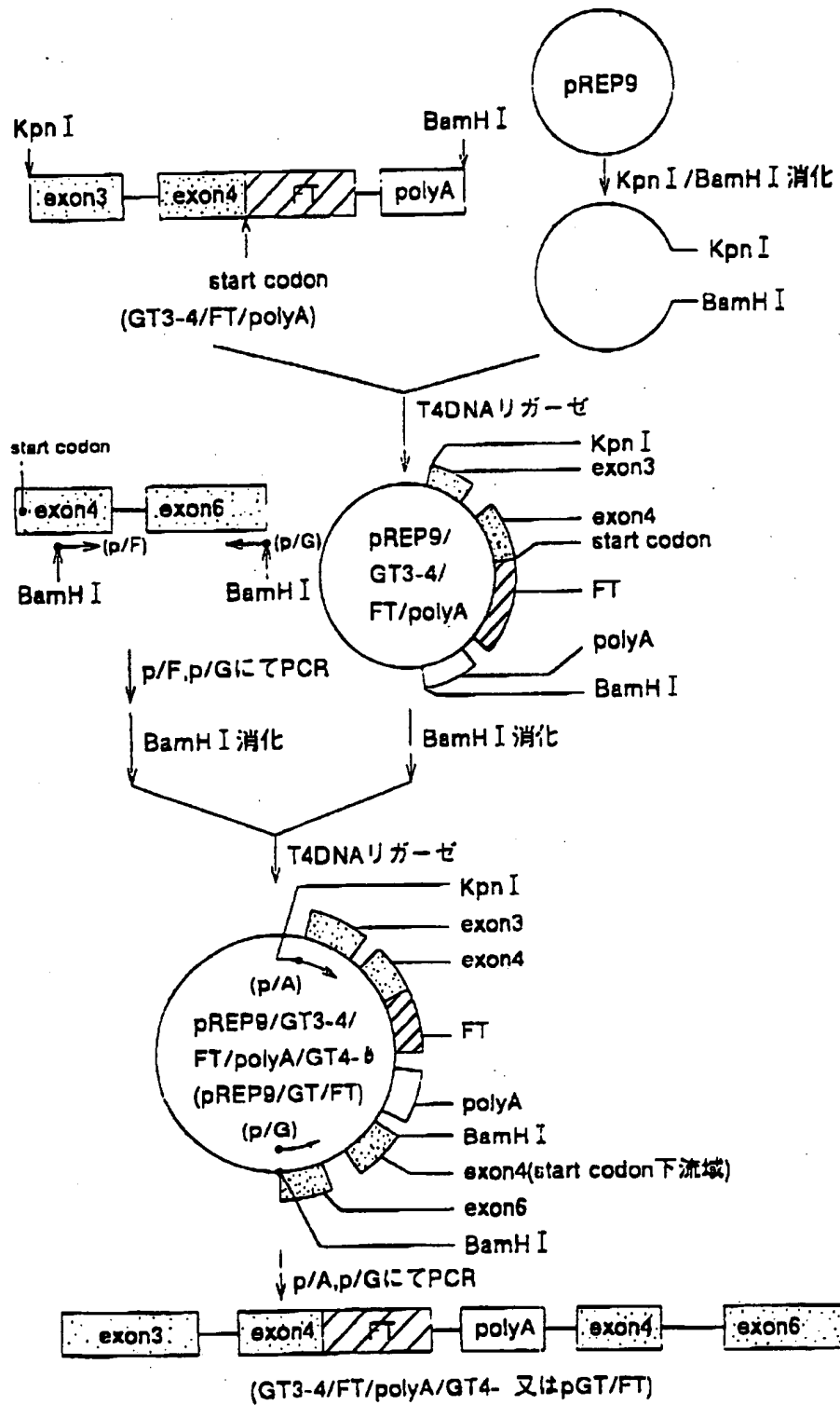


FIG. 8

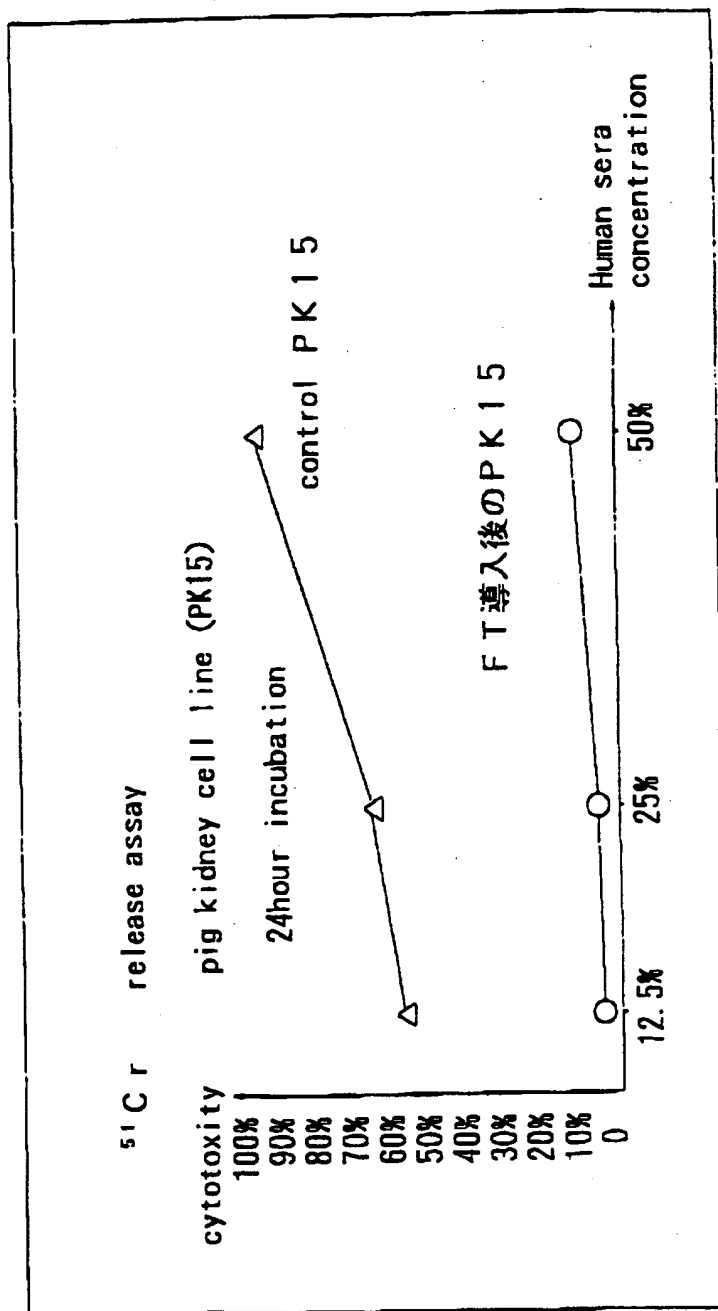


FIG.9

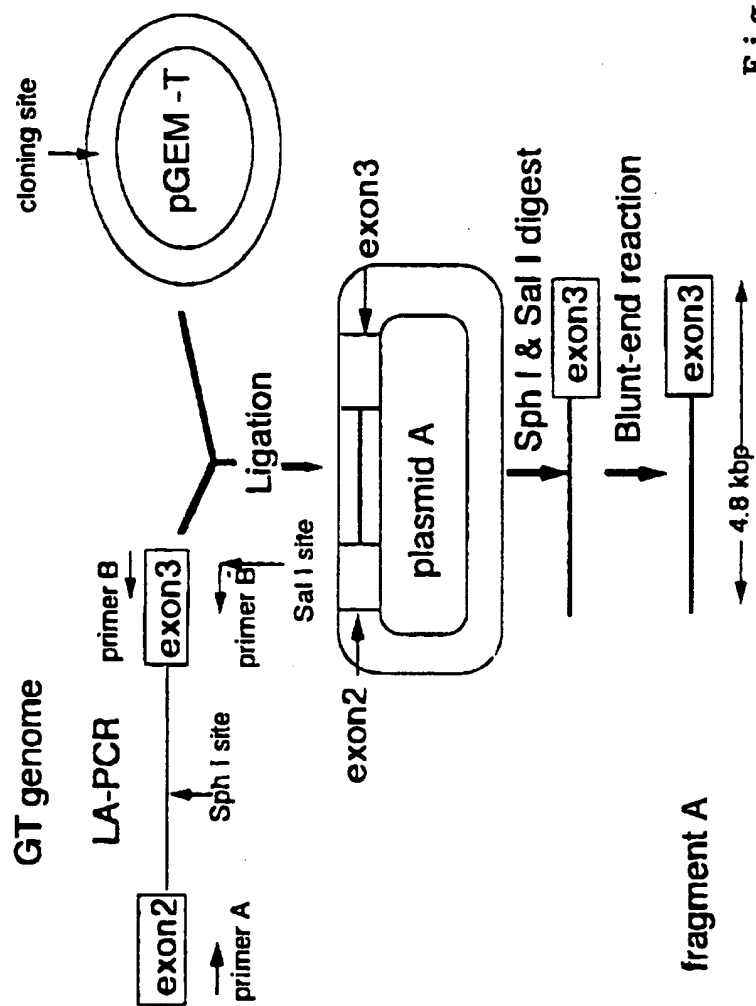


Fig. 10

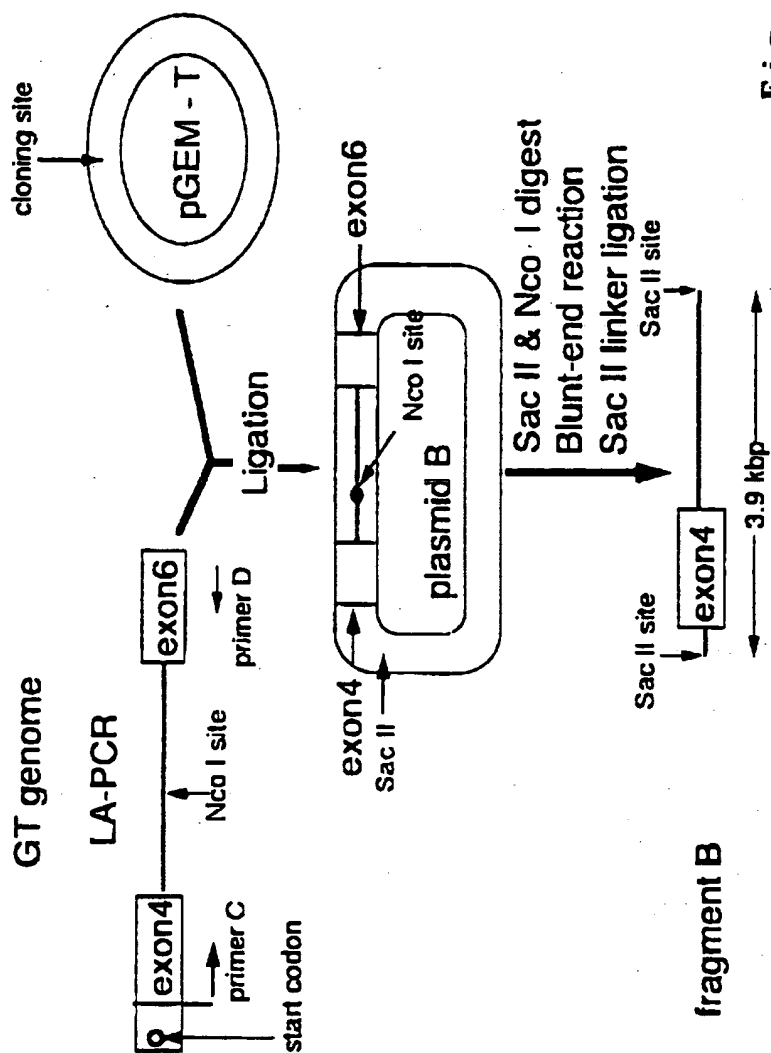


Fig 11

10/15

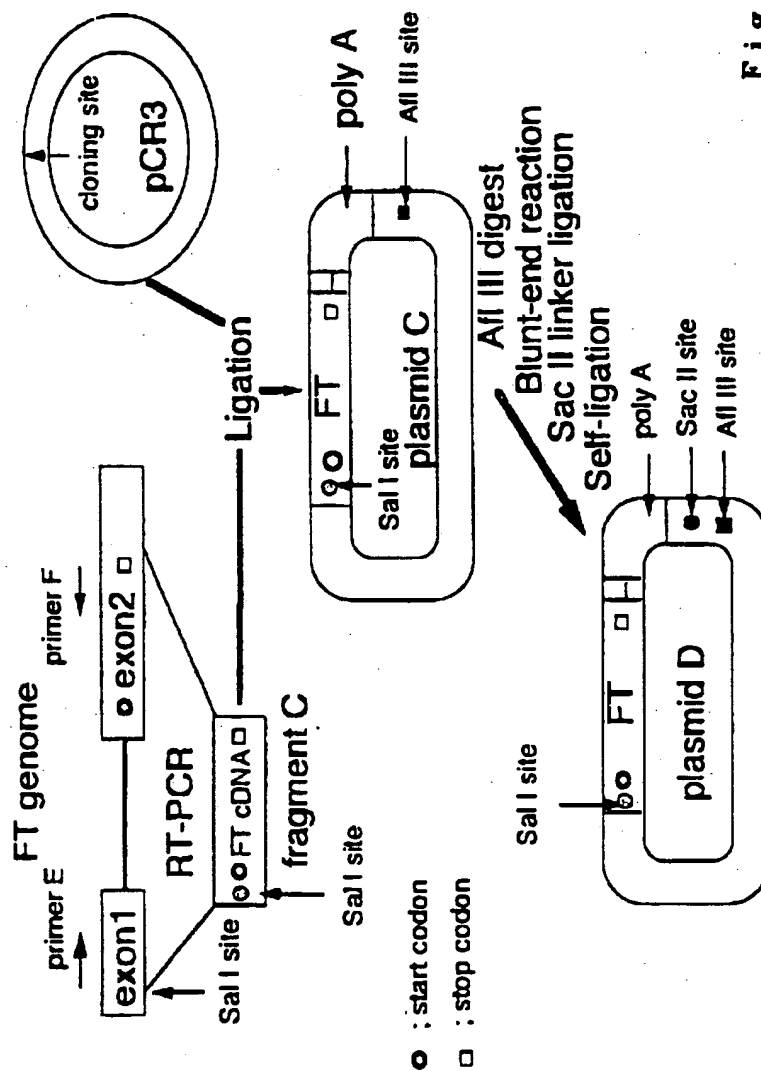


Fig. 12

11/15

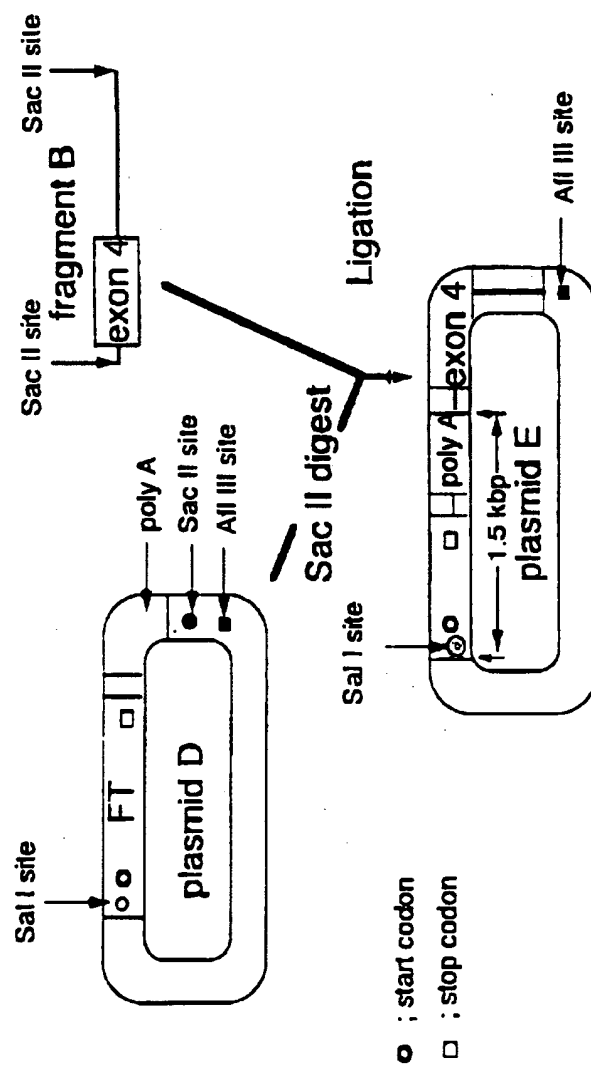


Fig. 13

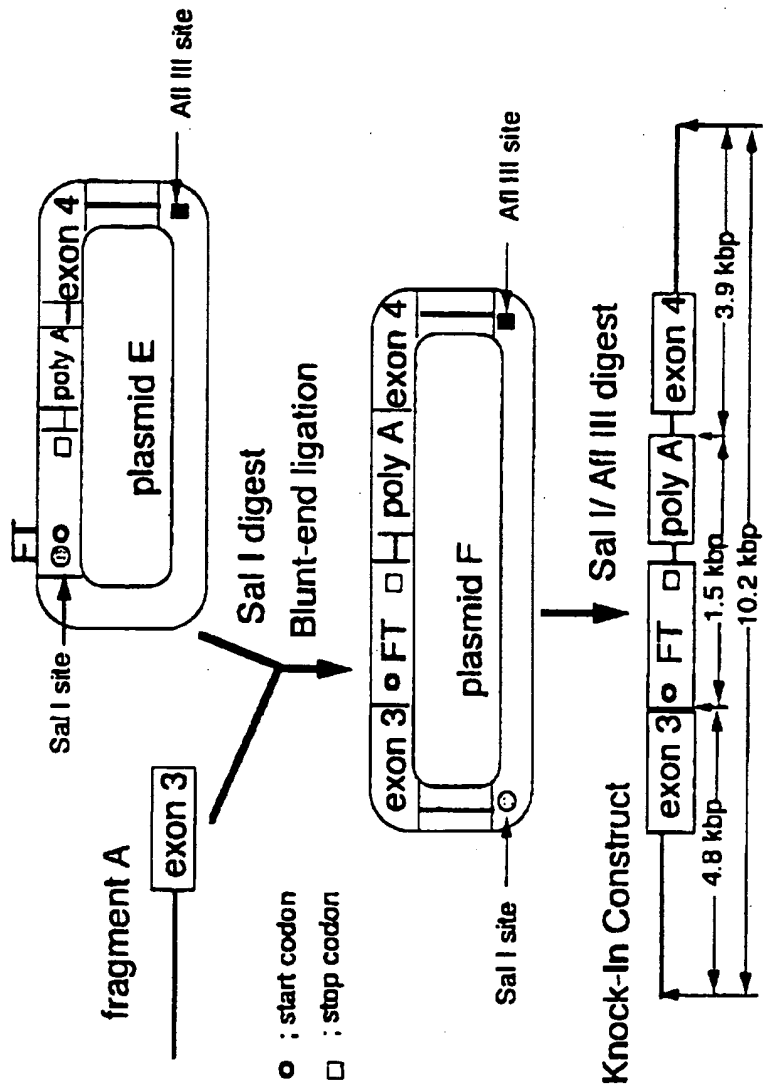


Fig. 14

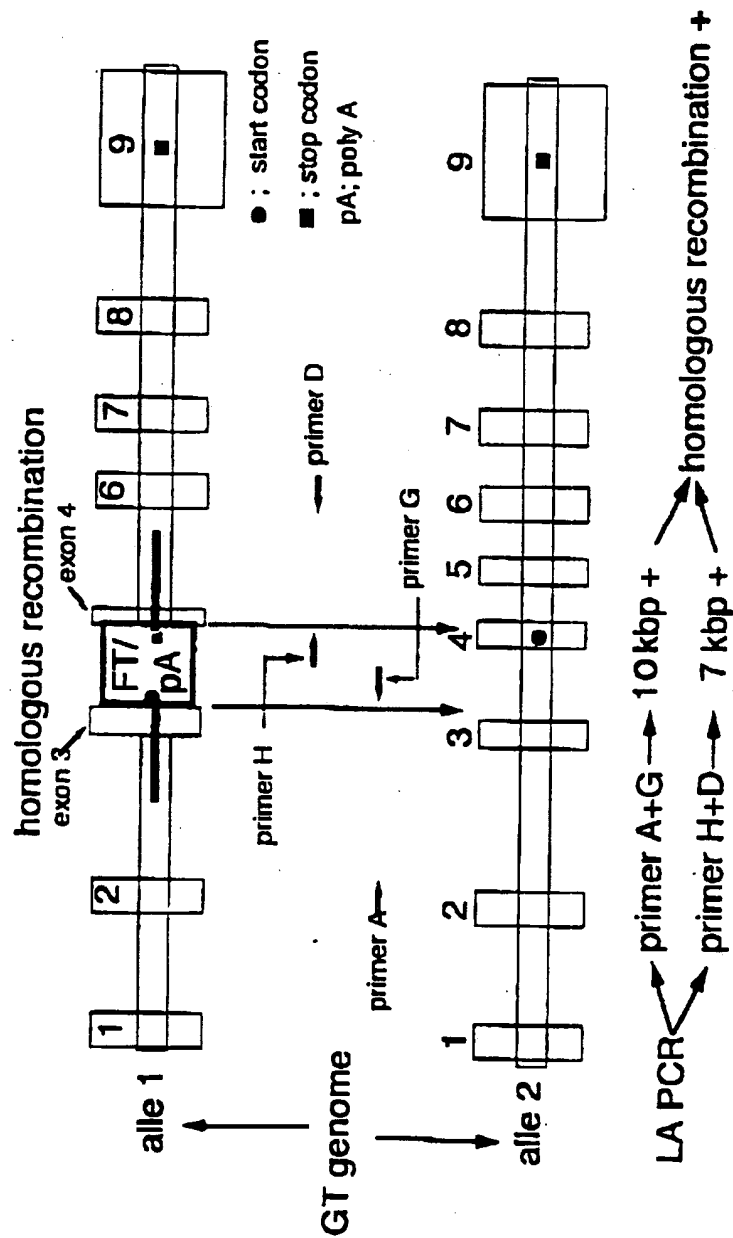


Fig 15

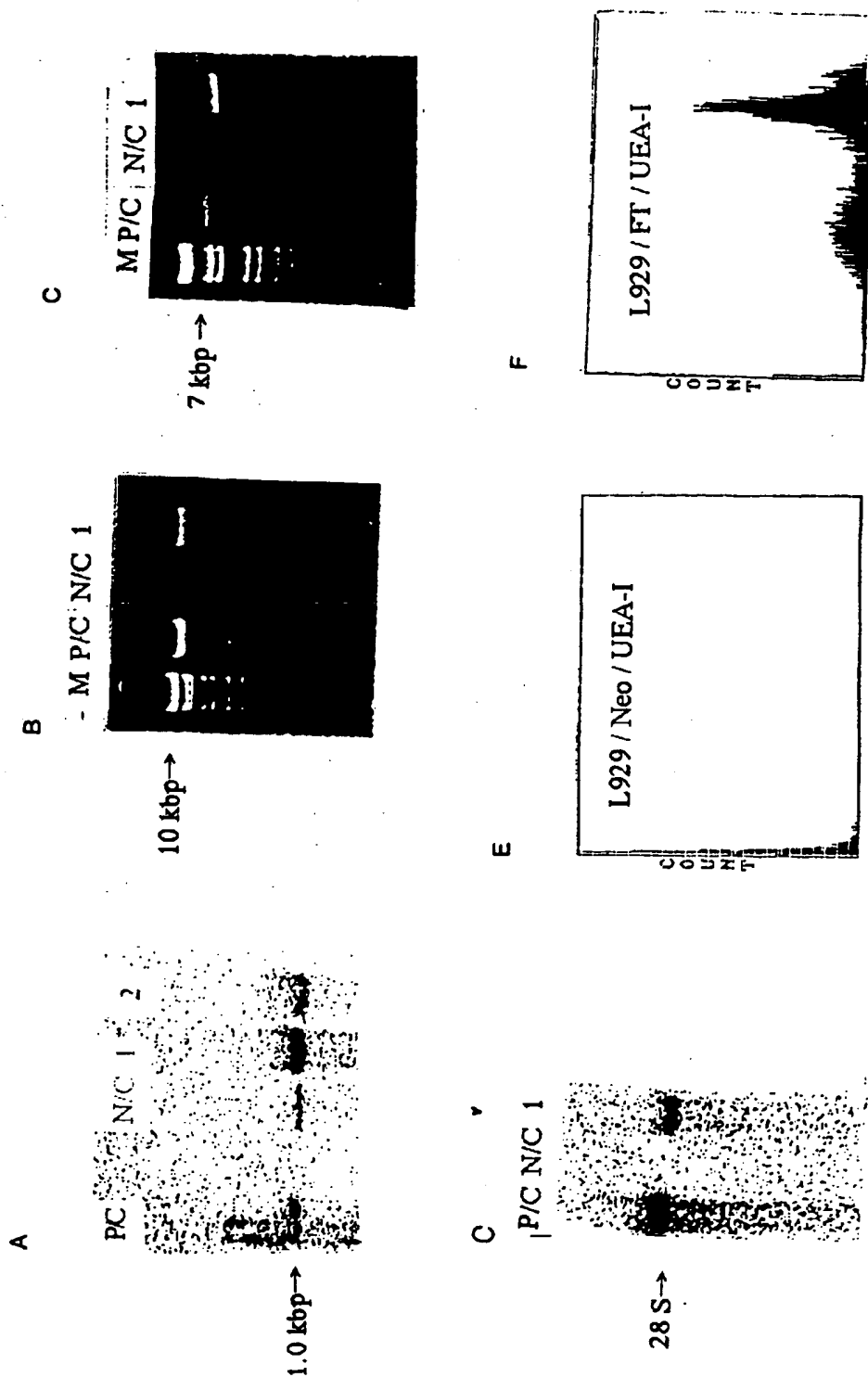


Fig. 16

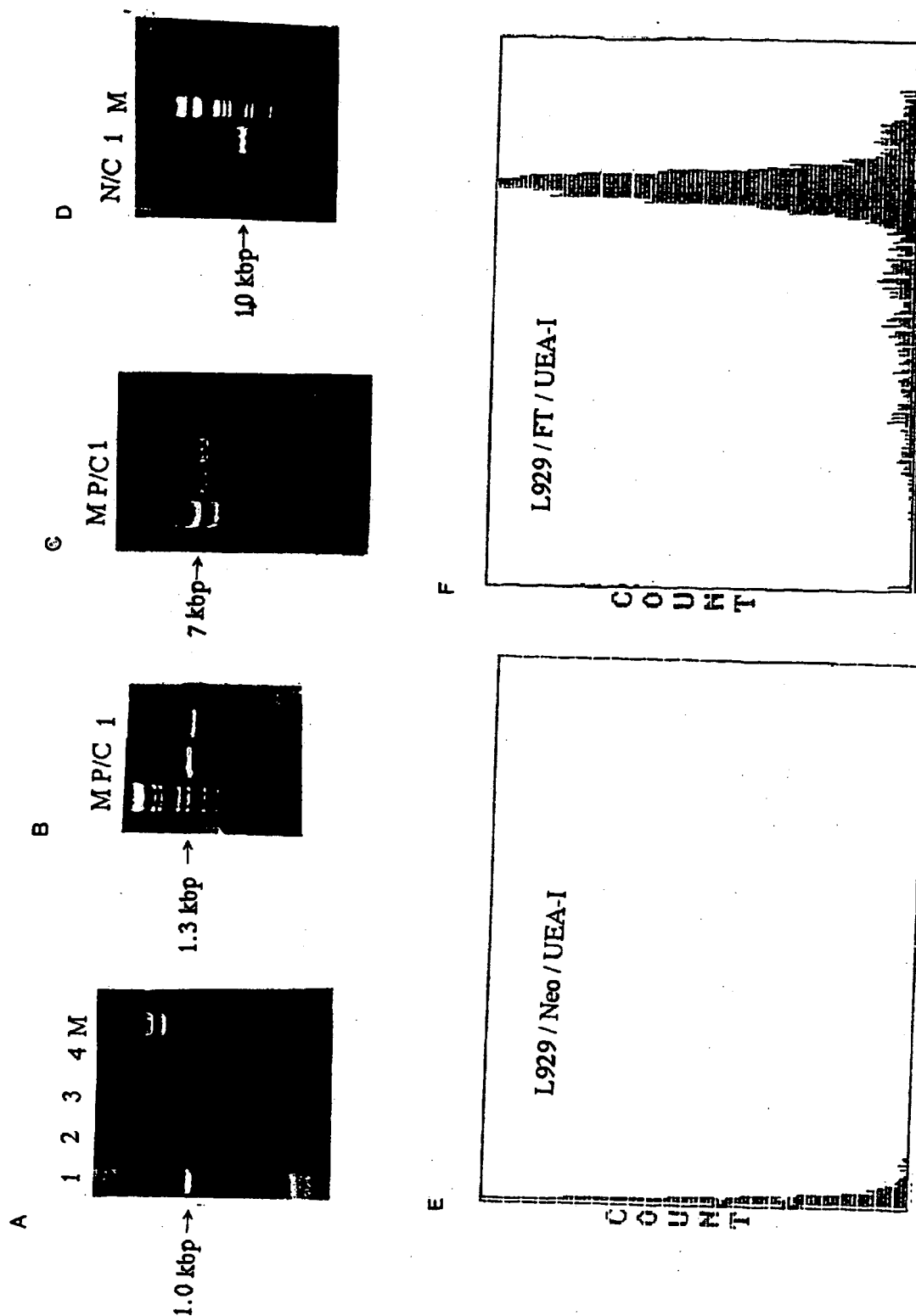


Fig. 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 91 (1994), p. 11153-11157, William L. Fodor et al. "Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection"	1 - 7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87 (1990), p. 6674-6678, Robert D. Larsen et al. "Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose: β -D-galactoside 2- α -L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen"	1 - 7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86 (1989), p. 8227-8231, Robert D. Larsen et al. "Isolation of a cDNA encoding a murine UDPgalactose: β -D-galactosyl-1,4-N-acetyl-D-glucosaminide α -1,3-galactosyltransferase: Expression cloning by gene transfer"	1 - 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 16, 1996 (16. 07. 96)

Date of mailing of the international search report

July 30, 1996 (30. 07. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00703

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Genes and development, Vol. 4 (1990), p. 1288-1303, Jolanta F. Kurowska et al. "A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase"	1 - 7
A	Transplantation Proceedings, Vol. 24, No. 2 (1992), p. 574-575, R. J. Fischel et al. 'Plasma Exchange, Organ Perfusion, and Immunosuppression Reduce "Natural" Antibody Level as Measured by Binding to Xenogenic Endothelial Cells and Prolong Discordant Xenograft Survival'	1 - 7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 96/00703

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁶ A01K 67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁶ A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 91 (1994), p. 11153-11157, William L. Fodor et al 'Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection'	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87 (1990), p. 6674-6678, Robert D. Larsen et al 'Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose: β -D- galactoside 2- α -L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen'	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86 (1989), p. 8227-8231, Robert D. Larsen et al 'Isolation of a cDNA encoding a murine UDPgalactose: β -D-galactosyl-1,4-N- acetyl-D-glucosaminide α -1,3-galactosyltransferase: Expression cloning by	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 07. 96

国際調査報告の発送日

30.07.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

印

2B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	gene transfer'	
A	Genes and Deveropment, vol.4 (1990), p.1288-1303, Jolanta F.Kukowska et al 'A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group α (1,3/1,4)fucosyltransferase'	1-7
A	Transplantation Proceedings, vol.24, No.2(1992), p.574-575, R.J.Fischel et al 'Plasma Exchange, Organ Perfusion, and Immunosuppression Reduce "Natural" Antibody Levels as Measured by Binding to Xenogenic Endothelial Cells and Prolong Discprdant Xenograft Survival'	1-7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.